STATENS VÄXTSKYDDSANSTALT
MEDDELANDE N:r 43

IMPERIAL MYCOLOGICAL INSTITUTE
27 NOV 1945

GRÖNMYKOS

förorsakad av *Metarrhizium anisopliæ* (Metsch.) Sorok.

I. Grönmykosen som biologiskt insektbekämpningsmedel

AV

G. NOTINI och R. MATHLEIN

II. Fysiologiska undersökningar över grönmykosens svamp

AV

D. LIHNELL

Med 21 resp. 10 textfigurer

WITH ENGLISH SUMMARIES

STOCKHOLM 1944

STATENS VÄXTSKYDDSANSTALT
MEDDELANDE N:r 43

GRÖNMYKOS

förorsakad av *Metarrhizium anisopliæ* (Metsch.) Sorok.

I. Grönmykosen som biologiskt insektbekämpningsmedel

AV

G. NOTINI och R. MATHLEIN

II. Fysiologiska undersökningar över grönmykosens svamp

AV

D. LIHNELL

Med 21 resp. 10 textfigurer

WITH ENGLISH SUMMARIES

STOCKHOLM 1944

Emil Kihlströms Tryckeri A.-B.
Stockholm 1944
22623

GRÖNMYKOS FÖRORSAKAD AV METARRHIZIUM ANISOPLIAE (METSCH.) SOROK.

Förord.

Användandet av organismer, som på ett eller annat sätt uppträda som fiender till skadeinsekter, i syfte att åstadkomma en decimering av skadegörarna, har tilldragit sig allt större intresse efterhand som kännedomen om dessa organismer ökats. I många fall ha dessa biologiska metoder visat sig utomordentligt värdefulla, speciellt utnyttjandet av parasitsteklar och rovdjur, men de hittills utförda undersökningarna över användbarheten av parasitära svamparter ha endast i undantagsfall givit lovande resultat. Anledningen härtill torde i första hand vara det förhållandet, att de svamparter, som gjorts till föremål för närmare studier, varit obligata parasiter, vilka icke förmått kvarleva på en plats i marken sedan värddjurens numerär minskats under en viss gräns. Teoretiskt erbjuder en obligat parasit endast ett temporärt skydd — så länge värddjursfrekvensen är tillräckligt hög för att vidmakthålla en stark kultur av parasiter — medan en fakultativ parasit, som även kan växa och fruktifiera som saprofyt har väsentligt större värde som potentiell biologisk faktor.

Sedan en sådan fakultativt parasitär svampart, som tidigare varit känd från Centraleuropa och europeiska Ryssland, anträffats även i vårt land har denna svamp gjorts till föremål för noggrannare studier i syfte att söka utröna dess användbarhet som biologiskt bekämpningsmedel. Undersökningarna ha gällt arten *Metarrhizium anisopliae* Metsch. (Sorok.), som ger upphov till en sjukdom, kallad grönmykos på grund av den ärggröna färgen hos konidierna, vilka efter en tid helt täcka huden hos angripna och dödade insekter.

Det första säkra fyndet i Sverige av *Metarrhizium anisopliae* gjordes den 4 augusti 1935 vid Ahlby Säteri i Södermanland. På denna lokal hade utlagts ett bekämpningsförsök mot larver av trädödare, *Cossus cossus,* vilka allvarligt skadat ett bestånd av balsampoppel. Under frekvensbestämningar av skadegörarna i ett par för ändamålet fällda obehandlade kontrollträd anträffades en utvuxen larv 12 cm från utgångshålet i en ställning, som tilldrog sig uppmärksamhet, då ingen temporär eller permanent puppbädd iordningställts. Larven vilade utsträckt i gången och

reagerade endast svagt vid beröring. Den stod uppenbarligen icke i begrepp att övergå i puppstadium, trots att den inträtt i det för den förpuppningsfärdiga larven karakteristiska tröga tillståndet — härpå tydde frånvaron av gnagspån och spånad kring larven. Anledningen till orörligheten uppfattades till en början som tillfällig och antecknades utan kommentarer i försöksprotokollet. Exemplaret gjordes emellertid till föremål för närmare studier i laboratoriet, där det visade sig att trögheten snabbt tilltog; efter två dygn var larven död, och efter ytterligare ett dygn började vita mycelborstar växa ut genom munöppningen, kring trakémynningarna och vid ändtarmsöppningen.

Det stod sålunda klart att larven — den enda av mer än 450 undersökta exemplar från samma lokal — spontant angripits av en parasitsvamp, som orsakat trögheten och sedan döden. Iakttagelsen gav uppslag till fortsatta studier över den anträffade svampens agressivitet mot larver av trädödare.

Utvecklingen av mykosen hos det iakttagna exemplaret visade i fortsättningen utomordentligt karakteristiska drag. De vita myceliehoparna bredde snabbt ut sig, sedan objektet flyttats till fuktig kammare, samtidigt som nya hyfer trängde fram genom det tunna kitinet vid segmentgränserna, tills larven var helt omvuxen av hyfer. Efter 9 dygn började hyferna vid larvens munöppning antaga knutig form; den förut jämna, sammetsartade hyfbeläggningen uppvisade hopfiltade partier, i vilkas periferi ljusgröna plattor började uppträda. Efterhand mörknade dessa plattor, samtidigt som de bredde ut sig över hela larvens hud. Vid en given tidpunkt var hela larven omgiven av en svampvävnad, vars yttre lager utgjordes av stora paket skarpt gröna konidier. Under det 14:de dygnet hade sönderdelningen av larvens mäktiga fettvävnad nått så långt, att flytande fett började sugas upp av hyferna och konidierna. I detta medium grodde konidierna snabbt och utvecklade en mycket rik hyfvegetation, vilken slutligen resulterade i en ny ansättning av konidier. Slutstadiet i denna utveckling utgjordes av en starkt förkrympt larvmumie, som helt och hållet omvandlats till en mörkgrön konidiemassa med intorkade hyfer.

Redan på ett tidigt stadium av denna process isolerades hyfer av svampen på maltextraktagar med tillsats av 0,05 % steriliserad kroppsvätska av *Cossus cossus*. Hyferna växte hastigt ut till rundade plattor av *Penicillium*-typ och bildade gröna konidier i stor mängd. Arten bestämdes till *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., vilken bestämning sedermera kontrollerats av F. H. van Beyma Thoe Kingma vid Centraalbureau voor Schimmelcultures i Baarn.

Med användande av detta utgångsmaterial samt av konidier från fynd på *Apion*-arter anordnades åren 1935—42 en serie orienterande undersökningar över möjligheterna att utnyttja den för landet nya parasitsvam-

pen som ett medel att bekämpa de svåråtkomliga larverna av *Cossus cossus*. Härvid gjordes snart den erfarenheten att svampen är utomordentligt aggressiv mot larverna i vissa utvecklingsstadier, varför dess parasitiska egenskaper upptogos till närmare studium.

Föreliggande meddelande avser att lämna en redogörelse för de undersökningar och försök, som utförts vid anstaltens zoologiska och botaniska avdelningar i syfte att närmare utforska parasitens användbarhet som biologiskt bekämpningsmedel mot olika skadeinsekter. Den första delen, som huvudsakligen behandlar svampens förhållande till skilda insektarter jämte utförda bekämpningsförsök, har utarbetats av G. Notini med undantag av det avsnitt, som rör svampens användbarhet mot förrådsskadeinsekter (kornmal), vilket behandlats av R. Mathlein. Svampens beroende av vissa fysiologiska miljöfaktorer ha undersökts av D. Lihnell, och resultaten framläggas i senare delen av detta meddelande.

I. Grönmykosen som biologiskt insektsbekämpningsmedel.

Av G. NOTINI.

Innehållsförteckning.

Sid.

Konidiernas groning 7

Konidiernas sedimentering och resistens i olika suspensionsmedier 11

Orienterande undersökning av konidiernas köldresistens 13

Hyfernas inträngande i värddjuren 13

Undersökningar över infektionens förlopp 19

Trädödaren, *Cossus cossus* 19

Kornmalen, *Tinea secalella* 26

Bekämpningsförsök i laboratoriet (Av R. MATHLEIN) 28

Bekämpningsförsök i spannmålsmagasin. (Av R. MATHLEIN) 31

Sädesbroddflyet, *Agrotis segetum* 34

Kålflyet, *Polia oleracea*, och grönsaksflyet, *Barathra brassicae* 37

Grässkadande jordflyn, *Agrotis spp.* 40

Gräsflyet, *Cerapteryx graminis* 42

Stora jordflyet, *Rhyacia pronuba* och ärtflyet, *Polia pisi* 43

Vaxmottet, *Galleria mellonella* 44

Andra *Lepidoptera* 46

Gallmyggor: *Contarinia tritici, Sitodiplosis mosellana, Contarinia pyrivora, Contarinia leguminicola* 46

Övriga insekter: *Collembola, Orthoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera* 50

English summary 54

Litteraturförteckning 56

Konidiernas groning.

En levande, intorkad konidie har trubbigt oval form. I konidiens inre urskiljes vid stark förstoring en ljusbrytande kropp, som följer ena långsidan och utbreder sig något i de båda ändpartierna.

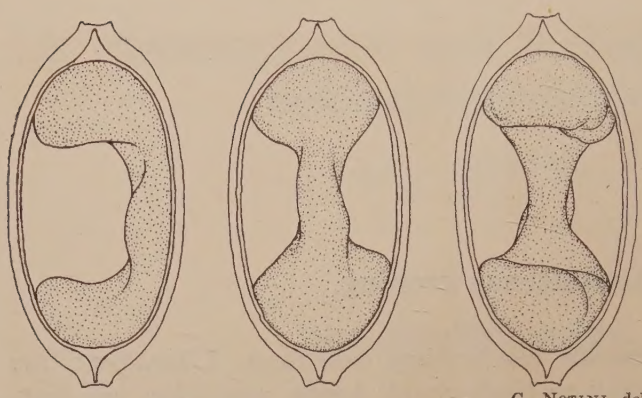
Det första tecknet till begynnande groning är en volymförstoring av konidien. Härvid sväller i regel denna vid ena polen till en päronformad kropp. Vid den ansvällda polen uppträder en förtunning av konidiehöljet, som efter ytterligare en kort tid löses upp vid platsen för hyfens utträde.

Frågan om vilka faktorer, som påverka konidiens groning, är av så stort intresse, icke minst för bedömandet av svampens användbarhet som biologiskt bekämpningsmedel mot skadegörare, att den upptagits till närmare undersökning.

Den nybildade konidien har en karakteristisk egenskap gemensam med konidierna hos släktena *Penicillium, Botrytis, Beauveria* m. fl., nämligen förmågan att hålla sig flytande på vatten under lång tid. Konidien vätes ej av vatten. Denna egenskap står troligen i samband med förekomsten av ett i vatten olösligt ämne på konidiehöljet och icke med strukturförhållanden hos detta hölje. Härpå tyda följande försöksresultat.

En behandling av torkade konidier med fettfärgämnet Sudan III ger tydligt positivt utslag, i det att höljet färgas intensivt rött. Efter behandling med 0,5 % såplösning försvagas färgbarheten högst väsentligt. Vid dessa senare färgningsförsök har ett stort antal konidier suspenderats i såplösningen, varefter omskakning i excenterskakapparat utförts med suspensionen. Efter 24 tim. har suspensionen centrifugerats under 15 min. vid 3.500 varv pr min., varefter centrifugatet uppsugits med pipett och överförts till rent destillerat vatten. Sedan såplösningen på detta sätt urtvättats vid upprepade omskakningar och centrifugeringar i rent vatten har konidiematerialet behandlats under 10 min. med Sudan III. En fullt markerad skillnad i färgbarhet mellan så behandlat material och friska konidier har iakttagits.

De såpbehandlade konidierna, som tvättats och torkats, ha förlorat sin förmåga att hålla sig flytande på vatten; de vätas utan svårighet och synas sålunda genom behandlingen ha befriats från den vattenrepellerande ytbeläggningen.



G. Notini del.

Fig. 1. Intorkade, nybildade konidier av *Metarrhizium*.
Dried, newly-formed conidia of *Metarrhizium*.

En liknande behandling av konidier med 0,5 % sodalösning har givit till resultat att konidiernas färgbarhet i Sudan III reducerats i än högre grad. Försök med osmiering av konidierna efter denna behandling ha ävenledes givit negativa resultat. Material av såp- och sodabehandlade konidier, som tvättats och torkats, har överförts på destillerat vatten, varvid konidierna inom 6 timmar påbörjat sin groning. Svällningen av konidierna igångsättes snabbare och jämnare efter behandlingen med de prövade suspensionsmedierna.

I syfte att lösa ut ett ev. befintligt vattenrepellerande ämne från konidiens yta har ett stort material av friska, nybildade konidier behandlats med benzol. Härvid har ett tunt lager konidier anbragts på ett objektglas på så sätt att konidier utskakats över ytan av destillerat vatten i en vid skål, varefter ett väl rengjort objektglas nedförts i vätskan och åter försiktigt upplyfts. Med denna metodik har ett enkelt lager väl åtskilda konidier bringats att fastna vid glasets båda sidor samtidigt som större konidiesamlingar avlägsnats. Sedan objektglaset med konidierna fått torka väl i torkskåp vid 25° C ha de fettlösande vätskorna tillsatts från ena kortsidan och samtidigt uppsugits från andra sidan av glaset. En vätskemängd av 15 cc har på detta sätt bringats att spola över glasets yta, varefter hela preparatet ånyo torkats i torkskåp. Över det intorkade preparatet har placerats en droppe destillerat vatten och slutligen har ett stort täckglas hastigt placerats över droppen. Vid den hastiga beröringen mellan vattendroppen och täckglaset bildas en mängd små luftblåsor, som plattas ut allt eftersom vattnet drages mot

Fig. 2. Groende konidier.
Germinating conidia.

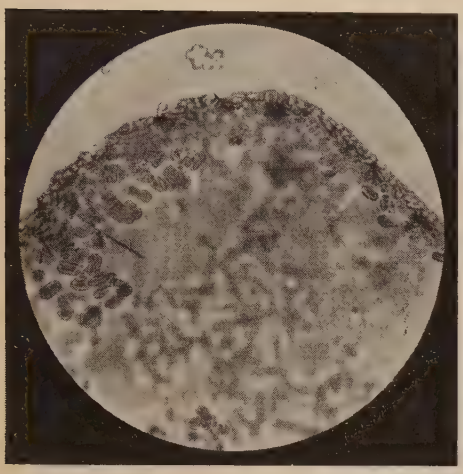


Foto G. Notini.

Fig. 3. De obehandlade konidierna samlas kring luftblåsans kanter.

The untreated conidia collect round the edges of the air-bubble.

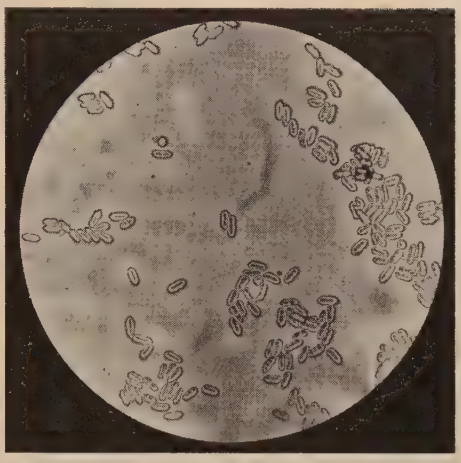


Foto G. Notini.

Fig. 4. De benzolbehandlade konidierna vätas lätt.

The conidia treated with benzole are easily moistened.

täckglasets kanter och bringar täckglaset närmare objektglaset. Dessa små luftblåsor bilda fuktiga kammare, där kondenseringen lätt kan iakttagas i mycket stor förstoring. Kring täckglasets kanter anbringas en ring av vaselin för att förhindra avdunstning och därav framkallade strömningar i vattnet.

Nästan omedelbart efter iordningställandet av preparatet börja ytterst små vattendroppar kondenseras i luftkamrarna, men kondenseringen sker kring konidierna så att alla konidier efter en kort stund äro inneslutna i vattendroppar, som anpassa sin form efter konidiens placering. Ett jämförande försök med obehandlade konidier visar, att kondenseringen här visserligen ävenledes i första hand sker kring konidierna, så att dessa flyta kring på kondensdropparna och ansamlas kring luftblåsans kanter, vilket icke är förhållandet med benzolbehandlat material. (Se fig. 4.)

Resultaten av dessa försök ge vid handen att den vattenrepellerande egenskapen hos konidien torde kunna återföras till förekomsten av en substans med högre ytspänning än vattnet; denna substans kan avlägsnas med såplösning, sodalösning eller tvättning med benzol. Såväl färgbarheten som reaktionen vid tillsats av såplösning, sodalösning eller benzol tyda på att denna substans är ett fett, till vilket antagande även följande biologiska experiment kunna anknytas.

Ett noggrant studium under stark förstoring av konidiernas reaktion vid applicering direkt på huden av *Cossus*-larver visar att de flesta enstaka konidierna gro inom loppet av något dygn (de konidier, som hamnat i större samlingar eller klumpar på larvhuden visa större obenägenhet att

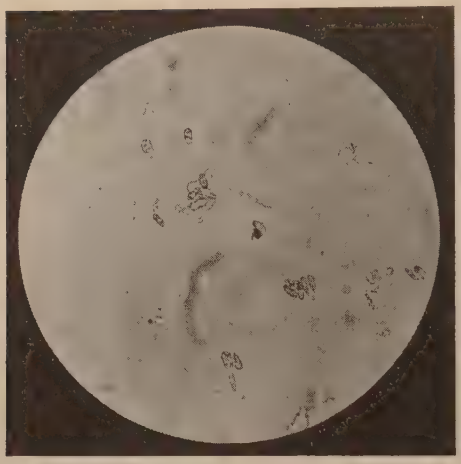


Foto G. Notini.

Fig. 5. Konidier på trikloretylenbehandlade partier av *Cossus*-kitin. Groningen sker långsamt. Jfr. fig. 6.

Conidia on parts of *Cossus* chitin treated with trichloroethyl. Germination is slow. Cf. Fig. 6.

Foto G. Notini.

Fig. 6. Konidier på obehandlat kitin. Svällningen och groningen sker snabbt.

Conidia on untreated chitin. Swelling and germination take place rapidly.

gro). Efter svällningen framträder hyftråden regelbundet som en tämligen tjock, glänsande vit tråd. I syfte att undersöka huruvida denna groning uteslutande kunde hänföras till den högre relativa fuktighetshalten vid hudytan har en serie försök utförts med tvättning av de centrala partierna av larvernas starkt kitiniserade dorsalsida. Tvättvätskan valdes med avsikt bland de fettlösande medlen: i första hand användes trikloretylén, som visade sig fullkomligt oskadlig för försöksdjuren vid den tillämpade försökstekniken.

Med en vätskedränkt bomullstuss gneds försiktigt ryggplåtarna på det lägesfixerade försöksdjuret tills fettlagret avlägsnats, vilket efterprövades genom anbringande av vattendroppar på den behandlade ytan. Efter ytterligare fuktning, varvid vattnet flöt ut över ytan, lufttorkades larven och ett antal konidier anbringades över hela dorsalsidan, sålunda även över icke behandlade partier. Hyfernas reaktion studerades vid 120 ggr förstoring.

Redan fyra timmar efter spridningen kunde konstateras att konidierna på de obehandlade segmenten börjat svälla och i en del fall grott ut till slangar av ungefär konidiens längd. Konidierna på den behandlade ytans centrala del visade inga spår av förändringar. Denna fullt tydliga skillnad blev under de närmaste dygnen alltmer påfallande; efter ytterligare fyra dygn hade konidierna på obehandlade partier allmänt grott och slangarna

vuxit ut till långa hyfer, vilka börjat förgrena sig, medan konidierna på den behandlade ytan fortfarande befunno sig på ett *tidigare utvecklingsstadium*. Även hos dessa hade emellertid enstaka exemplar börjat svälla, men antalet svällda konidier uppgick uppskattningsvis icke till 5 % av hela materialet. Ingen av konidierna på det behandlade kitinet hade grott.

Av försöken synes framgå, att behandlingen med fettlösande vätska i varje fall avsevärt minskat de gynnsamma betingelserna för konidiernas groning, som på kontrollytorna skedde i normal takt. Den direkta orsaken till detta fördröjande resp. förhindrande av groningen kan uppenbarligen icke vara humiditeten utan måste sökas i det förhållandet att kitinets naturliga fettlager avlägsnats. Det förefaller sålunda som om den första impulsen till konidiegroning på insekter är inverkan från kitinets fettlager på konidiens fettämnen, vilka efter allt att döma lösas upp, varefter den högre relativa fuktigheten direkt bringar groningsmekanismen i funktion.

Under sådana omständigheter kunna flera eljest svårförklarliga fenomen vid hyfernas reaktion på kitinhuden av en mängd insektarter få en tillfredsställande förklaring. En redogörelse för de överväganden, som föranledas härav, lämnas för de skilda försöksdjuren under resp. rubriker i ett senare kapitel.

Konidiernas sedimentering och resistens i olika suspensionsmedier.

Som ett led i undersökningen av ändamålsenliga spridningsmetoder ha speciella studier av konidiesedimenteringen i de vanligaste suspensionsmedierna — 0,5 % lösningar av såpa och soda — utförts. Vid dessa försök har följande metodik tillämpats.

Två graderade sedimenteringskärl fylldes med vardera 100 cc lösning, som framställts genom att resp. 0,5 gram såpa och 1,35 gram kristalliserad soda lösts i 100 cc vanligt vattenledningsvatten. Till varje kärl sattes ett gram kvartssand, som genom upprepade skakningar blandats homogent med konidier. Kärlen skakades därefter på exakt samma sätt 20 gånger, varefter de placerades för vidare observation intill varandra. Omedelbart efter omskakningen sjönko i såplösningen de större konidiesamlingar, som hopbakats på vätskeytan och icke sprängts under skakningen, till botten. I sodalösningen syntes större delen av konidiematerialet efter skakningen fortfarande flyta på ytan.

Efter två timmar sedimenteringstid togs prov från olika nivåer i sedimenteringskärlen. Proven från såplösningen utgjordes av 1/12 droppe (en droppe = 1/29 cc); sålunda 1/348 cc, vari räknades nedanstående antal konidier på resp. nivåer:

delstreck	80:	450, 588;	medeltal	519
»	60:	492, 504;	»	498
»	40:	608, 575;	»	591
»	20:	1112, 939;	»	1025

Proven från sodalösningen rymde likaså 1/12 droppe (en droppe = 1/19 cc); varje räknat prov utgjordes sålunda av 1/228 cc. Följande värden erhöllos:

delstreck	80:	380, 332;	medeltal	356
»	60:	743, 401;	»	571
»	40:	698, 785;	»	741
»	20:	670, 557;	»	613

I sedimenteringskärlet med sodalösning iakttogs en klar zon ovan delstreck 93; provräkning av vätskan i denna zon visade att konidierna sjunkit från denna nivå redan på två timmar. Konidiehalten per cc av de båda suspensionsmedierna uppgick sålunda efter två timmars sedimentering till

		sodalösning	såplösning
delstreck	80	81168	180612
»	60	130188	173304
»	40	168948	205668
»	20	139764	356700

Efter ytterligare 22 timmars sedimenteringstid togs nya prov på samma nivåer som tidigare. Härvid uppsögs vätskan i graderad 1 cc-pipett, varefter pipettspetsen sköljdes i rinnande varmt vatten; överskottsvätskan avtömdes, pipettspetsen torkades noggrant och efter ytterligare avpipettering utspreds 0,1 cc över en bestämd yta inom paraffingränser på objektglas. Omedelbart efter spridningen räknades samtliga konidier inom synfältet vid 120 gångers förstoring med hjälp av en okular-nätmikrometer. Metoden ger visserligen ingen uppfattning om det absoluta antalet konidier per volymenhet av suspensionen, men relativa värden för konidiehalten erhållas.

Resultaten av räkningarna framgå av nedanstående tabell.

Såplösningen

delstreck	antal konidier inom synfältet						medeltal
100	4	6	4	3	7	4	4,6
90	6	9	12	6	4	5	7,0
80	10	9	10	11	15	11	11,0
50	7	14	10	18	13	12	12,3
30	18	15	19	9	12	13	14,3
10	7	15	19	18	21	17	16,1
0	oräkneliga						

Sodalösningen

delstreck	antal konidier inom synfältet						medeltal
100	oräkneliga						
90	1	0	0	0	0	1	0,3
80	1	2	2	0	1	0	1,0
50	3	2	1	4	1	1	2,0
30	7	8	3	8	3	5	5,6
10	2	5	11	3	2	7	5,0
0	92	78	36	44	62	36	58,0

De erhållna värdena ge sålunda vid handen att såplösningen lämnar en betydligt mera stabil suspension än sodalösningen, ett förhållande av betydande intresse, då det visat sig att uppslamning i vatten icke ger tillfredsställande resultat på grund av konidiernas ringa vätbarhet.

Utstrykningspreparat med material från båda suspensionerna dels efter 2 och dels efter 24 timmars sedimentering ha visat att konidierna från såplösningen gro något fortare än de sodabehandlade; i båda fallen konstaterades groning efter resp. 3 och 7 dygn och konidiebildning efter resp. 7 och 9 dygn.

Orienterande undersökning av konidiernas köldresistens.

I syfte att pröva den ur praktisk synpunkt viktiga frågan om konidiernas motståndskraft mot kyla och tvära omkastningar i temperaturen har ett försök utförts med exponering av konidiematerial, som under två år förvarats i laboratoriet vid rumstemperatur. Den 30 november 1939 insattes konidier av detta material från + 19° i kylkammare med — 19°, där de lämnades 24 timmar. Den 2 december överflyttades de direkt till termostat med + 20° för ytterligare 24 timmars förvaring. Denna procedur upprepades vidare två gånger med lika långa mellantider och avbröts den 6 december, då konidierna efter 1 timmes förvaring i rumstemperatur anbringades i utstrykningspreparat på peptonagar. Den 8 december konstaterades stark växt i samtliga rör; efter ytterligare fyra dygn hade kolonierna utbildat rikligt med konidier.

Försöket hade sålunda ådagalagt att konidierna icke förlora sin grobarhet efter hastiga temperaturändringar.

Upprepade infektionsförsök med konidiematerial, som utsatts för sådan extrem värme- och köldbehandling, ha ävenledes givit positiva resultat.

Hyfernas inträngande i värddjuren.

Det vidare studiet av hyfernas tillväxt har koncentrerats på den i många fall avgörande frågan om hyfernas förmåga att söka sig väg från kitinets yta, där konidierna grott, till de kroppsdelar, där hyferna kunna utvecklas.

Vid dessa undersökningar användes med gott resultat en metod, som åsyftar att iordningställa en odlingskammare där växtsättet närmare kan studeras under stark förstoring. En larv av en mottaglig art, exempelvis *Tinea secalella*, styckas med tillhjälp av en mikrosax i segment, sedan larvens mjukdelar »manglats» bort med en insektnål. Det tunna, fullständigt genomskinliga kitinhöljet skäres upp försiktigt längs bukens mittlinje, varefter huden renskäres efter segmentgränserna. Operationen utföres i destillerat vatten, som uppsuges och förnyas ända till dess inga fria partiklar kunna iakttagas under mikroskop vid 60 gångers förstoring. Därefter anbringas en liten droppe konidiesuspension i starkt utspädd agarlösning på ett runt täckglas, där droppen får torka väl fast vid glasytan. Det tunna kitinstycket manövreras försiktigt från dissektionsskålen över på ett väl rengjort täckglas, där det får torka tills ytan icke är vätskig — ett enklare sätt är att pressa kitinet under filtrerpapper — varpå det ännu smidiga hudstycket placeras över den intorkade suspensionsdroppen

på täckglaset. Här pressas kitinet mot täckglaset så att det sluter tätt intill underlaget. En i förväg iordningställd kloss av peptonagar, vars sida gjorts mindre än hudstycket, anbringas på kitinet rätt över den med färg markerade konidiesamlingen, som på detta sätt kommer att ligga på andra sidan om kitinet. Slutligen vändes preparatet och fastsättes med vaselin eller kranfett över ett urslipat objektglas på samma sätt som vid förfärdigandet av »hängande droppe». Om större luftblåsor skulle bildas vid appliceringen av agarklossen kunna dessa utan risk för störningar utmanövreras med en varm nål innan odlingsförsöket igångsatts.

Visserligen komma i ett dylikt odlingsförsök i »hängande block» en mängd hyfer att växa ut mellan kitinet och täckglaset och på denna väg nå näringskroppen, men i regel söka sig ett tillräckligt stort antal hyfer vägen rätt genom kitinet. Tillväxtsättet, hyfspetsens penetrering av och hyfens förgrening i kitinet, studeras bäst om den iordningställda odlingskammaren förvaras i mörkt rum mellan observationerna.

I det följande skall först en redogörelse lämnas för resultaten av studier över hyfernas växt på opreparerade larver.

Hos larver av trädödaren, som utgöra särskilt lämpliga försöksdjur för detaljerade studier av hyfernas tillväxt, konstateras snart efter konidiernas groning en stark och snabb längdtillväxt av i huvudsak ogrenade hyfer. Till en början — innan en lämplig genombrottspunkt på kitinhuden träffats — växer svampen som en påfallande smal tråd omedelbart på kitinets yta. Växtsättet är utomordentligt karakteristiskt i det att hyfen följer små grunda fördjupningar, vilka hos de nämnda försöksdjuren i huvudsak löpa parallellt med segmentgränserna. Vid slutet av fördjupningarna ändrar hyfen tvärt riktning, söker sig väg nästan vinkelrätt mot sin tidigare bana tills den träffar en ny rännformig försänkning. Vid stark lokal infektion av ryggplåtarna utbildas en tät matta av parallellt löpande hyfer över larvens dorsaldel, som stundom kan helt täckas av hyfmassa innan genomväxning sker.

Hyfernas växtsätt ändras om de nå ett stigma eller via larvens sidovalkar växa fram till segmentgränserna. Här sker först en påtagligt rikligare förgrening, efter allt att döma föranledd av de gynnsammare fuktighetsförhållandena i andningsöppningens förgård eller under de skyddande hudvecken. De allra flesta hyfer gå emellertid normalt under på grund av torka, innan de nått en lämplig genomträngningspunkt.

Genom stigmat växa hyfens grenar sedan snabbt genom öppningsrummet och vidare in i den grova yttertrakén, varifrån de söka sig till de finare andningsrören. Här sker tillväxten långsammare med sparsam förgrening ett kort stycke, varefter hyfen — oftast i närheten av en trakégren — plötsligt temporärt stannar i växten och breder ut sig till en tydligt tjockare och lättare färgbar bildning. Kitinet i trakéns stödorgan visar

tecken till begynnande sönderdelning, vilket ger sig till känna genom starkt nedsatt hållbarhet hos vävnaden och påfallande reducering i färgbarheten med orcein. Kitinupplösningen fortskrider tills hyfen med en grov och i gentianaviolett starkt färgbar utlöpare tränger igenom andningsrörets vägg och in i den omgivande fettrika vävnaden.

I segmentgränsen sker en motsvarande förändring av hyfens växtsätt. Efter en stegrad förgreningsaktivitet utbildas hyfspetsarna till tydligt skönjbara förtjockningar, vilka taga åt sig färg i mycket högre grad än tidigare. Den fortsatta utvecklingen sker emellertid väsentligt långsammare än i stigmat. Avgörande är uppenbarligen larvens utvecklingsstadium, i det att kitinet hos larver, som nyligen ömsat hud, lättare angripes och genomväxes. Ett närmare studium av hyfens genombrytningsförmåga ger vid handen, att det övervägande antalet hyfer aldrig förmår utvecklas längre än till det stadium, som markeras av den temporära breddtillväxten. Ett mycket begränsat antal banar sig väg genom det av hyfen själv uppluckrade kitinet (jfr. Wallengren 1929; även Lihnell, sid. 74). Trots noggranna studier har det inte varit möjligt att konstatera förekomsten av predestinerande anatomiska egenskaper hos kitinet på genombrottställena; efter allt att döma spelar hyfens näringstillstånd den avgörande rollen, d. v. s. genombrottet sker icke på en viss svagt kitiniserad punkt — exempelvis genom en sensill eller en membran till känselorgan — utan kan ske var som helst på det unga kitinet, där detta avger högre fuktighet och där denna fuktighetsgrad hålles rel. konstant på grund av förekomsten av skyddande veck eller hudvalkar.

Wallengren (1929) har närmare studerat hyfernas inväxningssätt hos larver av *Pyrausta nubilalis*. Härvid kom han till den uppfattningen, att hyfernas genombrott är en produkt av både enzymverken och direkt mekaniskt tryck. Huden hos *Pyrausta*-larven uppvisar vissa strukturförhållanden, som enl. Wallengren påverka svamphyfernas inträngande. Kitinet är mot epidermis mycket starkt pigmenterat och mot hypodermis tydligt skiktat i fina, med ytan parallella vågor. Spår av genomgående radiära kitintrådar förefinnas icke. »På de ställen, där starkt aggressiva konidier fastnat, antager kitinhuden ofta eller möjligen alltid en gulaktig färg, som tämligen starkt skiljer den från de närgränsande områdena». Dessa fläckar uppstå kring konidier, som »tillvuxit i storlek men ännu icke trängt ned i huden». Av redogörelsen framgår sålunda, att svampen vid genombrottsställena bryter ned kitinet och förstör pigmentkornen i kitinets epidermisdel, men det framgår icke klart om Wallengren tillskriver konidierna eller hyferna denna väsentliga egenskap. En jämförelse med ett tangentialsnitt genom en sådan fläck (l. c. fig. 6 sid. 13) visar emellertid att Wallengren iakttagit verkan av växande hyfer. Konidierna skulle

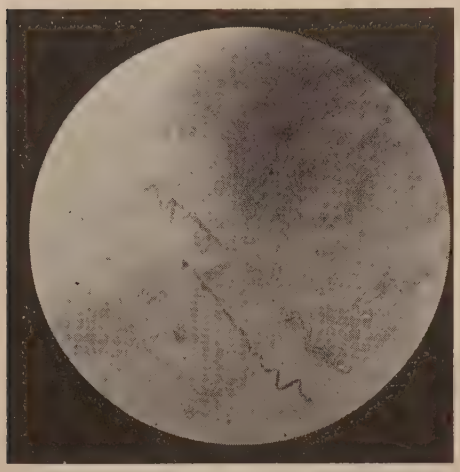


Foto G. Notini.

Fig. 7. Hyfernas växtsätt genom kitin. The way of growth of the hyphae through the chitin.

alltså icke förmå luckra upp kitinet eller lösa upp de för *Pyrausta*-larven karakteristiska trådpyramiderna till korniga, sönderfallande partier.

Svampens växtsätt under epidermis i det horisontal-lagrade kitinet överensstämmer väl med de iakttagna förhållandena hos larver av *Cossus cossus*. Sedan epidermis hos *Cossus*-larven genombrutits och destruerats vid angreppsstället, växa hyferna långa sträckor parallellt med de fina skikten, enligt noggranna undersökningar mellan de starkast färgbara vågformiga lagren. Uppenbarligen följer hyfen det minsta motståndets lag och bryter igenom kitinlagren först på ett ställe, där dessa tunnas ut. Tillväxten sker under ständigt avgivande av kitinupplösande enzym (kitinas), som nedsätter färgbarheten hos kitinet i hyfens omedelbara närhet och löser upp de finaste kitinelementen kring genombrottspunkterna. Trots omsorgsfull undersökning av ett stort antal snitt av larver med färsk infektion har ingen lägesförändring hos de olika vävnadslagren kunnat iakttagas, som skulle kunna tyda på mekaniskt tryck genom hyfernas tillväxt.

Hyfernas genombrytning av epidermis och kitinkutikulan hos larver av kvarnmott har ett väsentligt avvikande förlopp. Sedan konidierna grott — vilket i regel sker mycket snabbt efter anbringandet — grenar sig hyfen efter en mycket kort tillväxt. I omedelbar närhet av appliceringspunkten börjar epidermis ändra färg mot mörkare brunt, ett osvikligt tecken på att ett antal hyfer lyckats tränga genom epidermis och börja sitt förstörelsearbete i kitinets undre lager. I många fall stannar hyfens tillväxt vid detta stadium, innan den övervunnit kitinets motstånd; särskilt ofta inträffar detta stillestånd hos larver, vilka befinna sig på ett utvecklingsstadium mitt emellan två hudömsningar. Det har konstaterats, att många infekterade larver icke på detta utvecklingsstadium dödas av hyferna utan under den återstående tiden intill nästa hudömsning, till synes utan störningar, bära lätt iakttagbara mörka fläckar, som innehålla vilande hyfer. Att det här är fråga om en tillfällig stagnation av hyfernas tillväxt har framgått av det förhållandet att en sådan penetreringsfläck ånyo börjar breda ut sig, om larven dör som följd av angrepp från mera aggressiva hyfer.

Hos kvarnmottlarverna är kitinets horisontal-lagring icke så utpräglad

som hos *Cossus*-larverna. Visserligen kan en fullt tydlig sådan lagring konstateras — åtminstone hos äldre kitin — men de skarpa lagergränserna, vilka hos *Cossus*-larven i viss utsträckning bestämde hyfens växtsätt vid genombrottsstället, saknas helt och hållet. Svampens inväxning sker också till synes hur som helst, fullständigt obundet av lagringen. Genomväxningen kan ske lika väl tvärs igenom en kitinvalk på dennas mäktigaste ställe som genom det tunnare pansaret mellan valkarna eller vid segmentgränserna.

G. Notini del.

Fig. 8. Snitt genom kvarnmottkitin, 72 tim. efter infektion.
Section through flour-moth chitin 72 hours after infection.

Upplösningsprocessen i kitinet går även hos kvarnmottlarven relativt långsamt fram till ett stadium, som markeras av begynnande svårfärgbarhet. Därefter sker nedbrytningen av strukturen mycket snabbt, och resultatet blir i regel att kitinet förstöres totalt över hela larvkroppen utom mandiblerna, stödbalkarna i huvudkapseln och klammerhakarna på bukfötterna.

Hos kvarnmottlarven har iakttagits en intressant infektionsväg, som under vissa betingelser — främst låg temperatur och låg rel. fuktighet — synes vara dominerande. Vid infektionsförsök med stort material i slutna kammare med 30—40 % rel. luftfuktighet har erhållits mycket hög dödlighet hos larverna, trots att de vanliga yttre tecknen på infektion helt uteblivit. Svårigheten att avgöra den direkta dödsorsaken nödvändiggjorde en noggrann undersökning av mikrotomsnittat material. (Jämförelser med den låga mortaliteten i kontrollerna gåvo klart vid handen att orsaken till dödligheten hos försöksdjuren ovillkorligen måste sättas i samband med konidiebehandlingen, men frågan om behandlingens verkningssätt kunde icke avgöras på vanligt sätt genom undersökning av epidermis eller genom materialets placering i fuktig kammare.) Undersökningen av snitten visade, att dödsorsaken otvivelaktigt var hyfernas giftverkan, men sam-

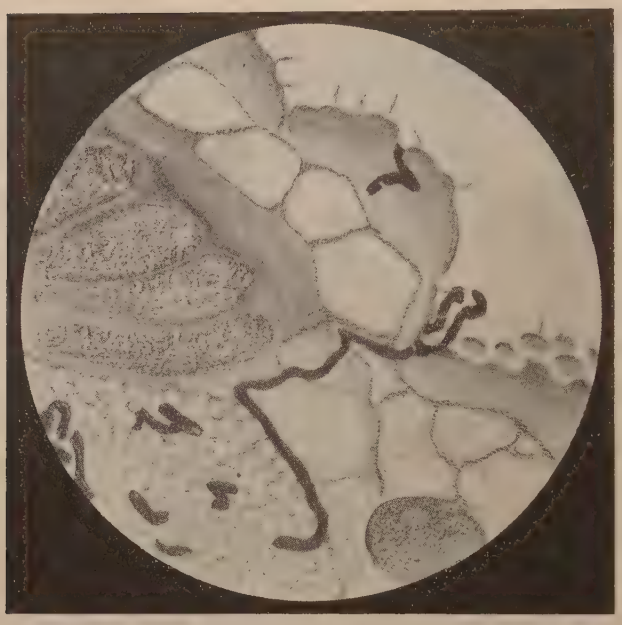


Fig. 9. Snitt genom kitin av kvarnmottlarv, 86 tim. efter infektion. Hyferna ha sökt sig väg mot corpus adiposum.

Section through chitin of flour-moth larva 86 hours after infection. The hyphae have made their way towards the corpus adiposum.

G. Notini. del.

Fig. 10. Snitt genom kitin av kvarnmottlarv, 120 tim. efter infektion. Larven har dödats och konidiebildningen har börjat.

Section through chitin of flour-moth larva 120 hours after infection. The larva has been killed and conidial growth has begun.

G. Notini. del.

tidigt konstaterades, att hyferna trängt in i larvens kropp via tarmkanalen. Särskilt starkt infekterade partier voro oesophagus yttre delar kring mandiblernas fästen samt övergången till matstrupen.

Undersökningar över infektionens förlopp.

Trädödaren, Cossus cossus.

Sedan hyferna genombrutit kitinet sker en utomordentligt snabb tillväxt innanför kitinmodercellerna, varvid hyferna oftast följa parallellt med bindvävsstråken. Dessa genombrytas emellertid utan svårighet, och i detta stadium, då hyfen når kontakt med de större kroppsvätskefyllda kaviteterna mellan bindvävsstråk och andra organ (muskler, nervskidor, trakeer, imaginalskivor), inträder ett kritiskt stadium i infektionen. På snitt av nyligen infekterade *Cossus*-larver, vilka ännu ha full rörelseförmåga och som ännu ej förete tecken på sjukdom, kan regelbundet konstateras en mycket tydlig anhopning av stora amöboida celler kring hyfspetsarna. Dessa amöboider äro karakteristiska komponenter i den friska larvens kroppsvätska och uppträda sålunda på samma sätt som leukocyter; den uppenbarligen enzymatiska retning, som utgår från hyferna, utlöser en ansamling av förstörande element i kroppsvätskan. Vanligen karakteriseras ett inväxningsställe av en hylsformig tratt av tätt liggande leukocyter kring hyfspetsen, som på äldre stadier (särskilt tydliga på 15—20 μ tjocka snitt) uppvisar stark ansvällning och granulering av innehållet. Efter allt att döma synes sålunda hyfspetsens tillväxt kunna försenas resp. förhindras av leukocyterna, ett antagande, som stödes av det konstaterade förhållandet att en mängd hyfer atrofiera i de distala delarna och upplösas. I samband med dessa atrofier iakttages regelbundet en riklig förekomst av olikformiga, kornrika leukocyter kring inväxningsstället.

Såsom karakteristiskt för hyfernas vidare inväxning i larven kan angivas en tydlig förkärlek för fettvävnad. Medan ett stort antal, hos enstaka undersökta larver flertalet, av de hyfer, som efter genombrottet av kitinet stött på större muskelbuntar och djupa snedgående bindvävsstråk, upplösts eller deformerats, ha i regel de hyfer som råkat hamna direkt på någon del av larvens omfångsrika fettlager, speciellt i fettkroppen, corpus adiposum, förblivit vitala och i snabb takt utbrett sig över och inträngt genom vävnadens hölje, tunican. Corpus adiposum uppbygges huvudsakligen av fett, men även förekomst av äggvita och små mängder kolhydrat kunna påvisas. Vid inväxningen i homogen kroppsfettvävnad synes hyfens väg icke vara preformerad av de rikligt förekommande bindvävsbanden; hyfen växer till synes oregelbundet och visar stark tendens till förgrening. Fettvävnaden närmast hyfen undergår en typisk förändring i det att fettcellernas väggar destrueras och innehållet avskiljes i form av små fettdroppar, som flyta ut i kroppsvätskan och blandas med dess element. I detta stadium kan ingen reaktion hos de rörliga »blod»-cellerna iakttagas

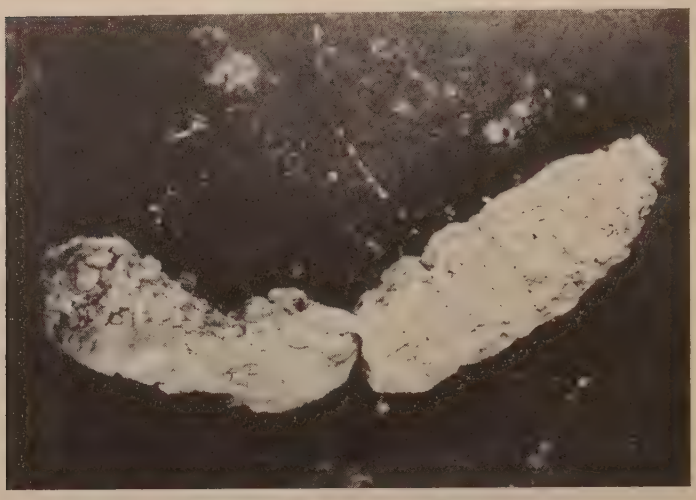


Fig. 11. *Cossus*-larv, mumifierad av mykos.
A *Cossus* larva mumified by muscardine.

och det måste antagas att leukocyterna berövats sin förmåga att spärra eller upptaga och förstöra främmande kroppar och sönderfallande vävnadsceller.

Denna hyfernas konstaterade benägenhet att i första hand genomväxa corpus adiposum är svårförklarlig. Enligt resultaten av detaljundersökningar rörande hyfernas tillväxt på olika näringssubstrat gynnas utvecklingen ej påfallande av fettsyror (jfr. sid. 75); uppenbarligen betingas den iakttagna affiniteten dels av förekomsten av både äggvita och kolhydrater (se vidare LIHNELL sid. 83) och dels av den rel. avsaknaden av cirkulationsorgan för kroppsvätska i corpus adiposum. Medan kroppsvätskan upptager en volym av c:a 24 % av övriga organ rymmer corpus adiposum endast omkring 5 % fri vätska.

I det stadium av infektionen, som markeras av fettkroppens genomväxande, övergår det angripna djuret i ett orörligt tillstånd; det har emellertid ännu ej förlorat sin retbarhet utan reagerar fullt tydligt både för mekanisk och kemisk retning. Näringsupptagandet är helt och hållet inställt och lokomotionen förhindrad. I samtliga iakttagna fall, där infektionen nått detta stadium, har den lett till döden.

Infektionens vidare förlopp utmärkes av genomväxning och förstöring av tarmväggen och spottkörtlarna i snabb takt. Inuti tarmhåligheten växa hyferna speciellt rikligt och under stark förgrening på de entodermala delarnas slemhinnor. Sedan spottkörtlarna uppnåtts växa hyferna ofta åter ut, vanligen med korta, tydligt tjockare förgreningar genom oesophagus, till vita penselformiga anhopningar, vilka äro tydligt iakttagbara för blotta

ögat. Den höggradiga destruktion, som nu drabbat hela larven, medför givet djurets död.

Den fortsatta utvecklingen är i utomordentligt hög grad beroende på fuktighetsförhållandena i larvens uppehållsplats. Av största betydelse är ett närmare studium av dessa förhållanden på de platser, där larverna normalt uppehålla sig, och redan ett ytligt studium härav ger vid handen, att betingelserna måste vara optimala för svampens vidare genomväxning och fruktifiering. I de gångar i levande träd, där trädödarelarverna normalt tillbringa tre år som larver före förpuppningen, närmar sig den relativa fuktigheten maximum, och det torde kunna anses fastslaget att luften i den av larven förfärdigade puppbädden eller i övervintrings- och vilokammaren är mättad med vattenånga. Infektionen sker oftast — av lätt insedda skäl — rätt ytligt i gångsystemet, och det har visat sig att larverna i regel uppsöka ett djupt inne i stammen beläget hålrum kort efter infektionen. Vid denna höga fuktighetsgrad sker den fortsatta destruktionen snabbt och grundligt; efter kort tid — varierande med temperaturen — är larven helt täckt av hyfer, vilka på larvkroppens yta, inuti tarmkaviteten och i munhålan utbilda kompakta konidiekakor.

Sedan det angripna djuret sålunda dött och förvandlats till en mumie, täckt med konidier, utgör det en för den övriga larvpopulationen synnerligen riskabel smittkälla. I starkt angripna träd, vilka allvarligt hotas av skadegörelsen, utnyttja oftast flera larver det gemensamma gångsystemet — det är ju ingalunda sällsynt att ettåriga larver anträffas tillsammans med äldre exemplar i samma gång. Detta förhållande har givit anledning till en serie bekämpningsförsök mot unga larver, vilka iakttagits som svåra skadegörare på prydnadsträd.

Bekämpningsförsök vid Ahlby säteri (Södermanland).

I omedelbar närhet av den plats, där *Metarrhizium anisopliae* första gången anträffades, konstaterades sommaren 1939 ett synnerligen starkt angrepp av *Cossus*-larver på ett 60-årigt bestånd av balsampoppel, *Populus balsamifera.* Av de svårast angripna träden, vilka stodo i allé, utvaldes fyra för infektionsförsök med grönmykos. Med hjälp av en enkel pipett av glasrör och gummiblåsa insprutades en vattensuspension av konidier c:a 5 cm djupt in i varje utifrån iakttagbar gång. Påföljande vår i mars månad blåste ett av försöksträden ned på grund av larvernas gnagkanaler, vilka minskat stammens böjfasthet. Stammen sågades upp i 25-centimeterskubbar, som klövos och noggrant undersöktes på sitt levande innehåll; härvid isolerades 34 larver, av vilka 22 voro döda i typiska symtom på grönmykos, medan ingen av de övriga visade tecken till infektion. För kontroll inlades de till synes friska larverna i trästycken med gångar, varefter klossarna placerades i en behållare med anordningar för befukt-

ning. Efter ytterligare fyra månader voro alla försöksdjuren döda i grönmykos.

Försöket gav sålunda till resultat att larvpopulationen i det nedblåsta trädet, vilket undersöktes tidigare än beräknat, hade reducerats med nära 65 %; infektionen av de övriga 12 larverna är mera svårbedömbar. Då möjligheten att dessa larver infekterats av konidier från klossarna icke kan anses utesluten, torde försiktigheten bjuda att betrakta dem som representerande negativt utslag.

En undersökning enligt samma metodik av de återstående tre försöksträden, vilka för ändamålet fälldes på hösten 1940, gav följande resultat. I träden anträffades resp. 83, 107 och 12 mumier av grönmykosangripna larver; 7 till synes friska larver anträffades i det minst angripna trädet. I de båda starkt angripna försöksträden anträffades inga levande larver. Av de levande larverna förolyckades ett exemplar, vilket vid mikroskopisk undersökning visade sig innehålla rikligt med hyfer omedelbart under kitinet inom ett skarpt begränsat område på prothorax, som märkbart avvek från de övriga segmenten genom sin mörka, oregelbundet fläckiga färg. Hos de övriga fritt rörliga larverna kunde inga symtom på mykos konstateras.

Bekämpningsförsök vid Sämstad (Bohuslän).

För ytterligare prövande av möjligheten att bekämpa trädödarelarver i dyrbarare prydnadsträd utlades i slutet av juni 1941 ett parallellförsök med tre upprepningar vid Sämstad i Bohuslän, där larverna iakttagits som förödande skadegörare på planterad björk. Spridningen av konidierna utfördes enligt den »torra» metoden, d. v. s. medelst en glaspipett med kraftig gummiblåsa, som fylldes med en blandning av 98 % kiselgur och 2 % konidier. Blandningen blåstes med pipetten in i gnaghål i försöksträden, från vilka den utomordentligt karakteristiska lukt, som alltid utmärker trädödareangripna björkar, var tydligt förnimbar.

Påföljande år i juli månad sågades träden upp och undersöktes noggrant, varvid sammanlagt 78 larvmumier anträffades; samtidigt konstaterades förekomsten av ytterligare 14 övervintringskammare, vilkas innehåll tydligt visade att de förfärdigats av yngre larver, som angripits redan sommaren 1941 och därefter helt sönderdelats. Av speciellt intresse var den fullständiga frånvaron av friska levande larver i träden.

Samma år iakttogs ett hundratal meter från försöksträdens växtplats en tidigare ej uppmärksammad massförekomst av *Cossus*-larver i ett gammalt sälgbestånd. Angreppet på sälgen var otvivelaktigt av yngre datum. Vid röjning i beståndet anträffades tillfälligtvis en ettårig larv, som dödats av *Metarrhizium*, ett förhållande, som gav anledning till närmare studier. Smittspridningen från infektionsplatsen kunde med all säkerhet icke hänföras till aktiv vandring av unga larver — den för arten karakteristiska

vandringen iakttages regelbundet blott hos äldre stadier. Möjligheten av konidiernas spridning med vinden kunde visserligen icke helt uteslutas men måste bedömas som mycket liten i betraktande av det långa avståndet. Den konstaterade infektionen syntes därför till en början gåtfull, i all synnerhet som det knappast kunde vara fråga om spontan infektion. Först vid ett närmare studium av insektfaunan på platsen kunde en rimlig hypotes uppställas beträffande konidiernas spridning från de ursprungliga försöksträden till den isolerade kolonin i sälgbeståndet. Genom larvernas gnagskador på björkarna orsakades ett ymnigt savflöde kring de partier av stammarna, som utsatts för den svåraste skadan. Den utsippande saven bragtes snart i jäsning och fungerade under hela den varma årstiden som samlingsplats för en mängd skilda insektarter, som lockats av den rikliga näringen. Bland dessa insekter dominerade myrorna, vilka icke endast uppehöllo sig kring de savförande delarna utan också, enligt iakttagelser före björkarnas uppsågning, sökte sig in i gångarna. Tyvärr kunde inga undersökningar utföras på de myror, som uppehöllo sig på försöksträden, men ympningar på platta från material, som hämtats från puppkamrarna i en 20 meter från trädens växtplats belägen stack av röda stackmyran, gåvo starka positiva utslag. Sedan det sålunda fastställts att arbetarna av den röda stackmyran kommit i beröring med konidier under sina besök i försöksträden och passivt medfört rikligt med konidier ända in i stackens djupare delar, torde det kunna anses som högst sannolikt att konidiespridningen till den yngre larvkolonin skett med myrorna.

Infektionsförsök i laboratoriet.

Ovan anförda undersökningar över mottagligheten hos larver av trädödare för angrepp av *Metarrhizium* ha kompletterats med ett stort antal artificiella infektioner av försöksmaterial i laboratoriet. Resultaten av dessa infektionsförsök kunna sammanfattas i följande punkter.

1. Total immunitet har icke konstaterats hos larver av denna art, då samtliga infekterade individ efter varierande inkubationstid dukat under för grönmykos.

2. Den form av resistens mot angrepp, som tagit sig uttryck i särskilt lång inkubationstid, har i samtliga undersökta fall kunnat hänföras till tidpunkten för infektionen; om konidierna anbringas på en larv, som närmar sig hudömsningsstadiet, fördröjes hyfernas inväxning genom kitinet avsevärt. Konidiernas groning synes däremot icke vara beroende av kitinets ålder. Om infektionen av larven sker omedelbart efter ett hudbyte går inväxningen synnerligen snabbt. Dessa förhållanden medföra att stora skillnader i inkubationstid kunna konstateras, då larverna tillväxa långsamt och i samband därmed byta hud med långa mellantider.

3. *Cossus*-larverna tillhöra de mest mottagliga av alla undersökta insekt-

arter i det att redan ett mycket litet antal konidier ger upphov till fatal mykos.

Ett viktigt led vid prövande av användbarheten hos en parasitär svamp mot skadeinsekter är en undersökning av mykosens utbildning under olika fuktighetsförhållanden. Av redogörelse i det föregående har framgått att betingelserna för konidiernas groning på larvhudens yta i första hand äro avhängiga av förekomsten av fettsubstans (fettlösande substans) på kitinet. Detta konstaterande är av väsentlig betydelse då ju infektionen främst betingas av en snabb och ostörd konidiegroning. Det måste emellertid framhållas att en maximal konidiegroning ingalunda garanterar uppkomst av en fatal mykos; mycket ofta iakttages hur hyferna skrumpna och atrofieras innan de nått ett gynnsamt penetreringsläge. För hyfernas fortsatta tillväxt och för deras viktigaste prestation — inväxningen genom kitinet — kräves uppenbarligen speciella betingelser, främst en betryggande fuktighetshalt. En registrering av fuktighetsförhållandena på larvens olika delar är icke genomförbar, varför diskussionen härav måste baseras på sannolikhetsskäl, men flera iakttagelser tyda otvivelaktigt på att fuktighetsgraden i »mikroklimatet» kring segmentets skilda partier är avgörande för hyfens tillväxt.

Om en tvåårig *Cossus*-larv, som nyligen genomgått hudömsning, infekteras genom överpudring med konidier (varvid konidierna lämpligast siktas ut över djuret med hjälp av müllergasduk på ett avstånd från objektet av 15—20 cm) och därefter placeras i hygrostat med 35 % relativ fuktighet, konstateras redan efter 24 timmar begynnande konidiegroning över alla segmentens dorsalsida. Även en del av de konidier som hamnat på huvudkapseln svälla och börja gro ut till korta slangar. Så inträder alltid en hämning i tillväxten; denna hämning sammanfaller regelbundet med det stadium, som markeras av hyfens försök att övertvära de åsar och valkar, som i stor mängd förekomma på *Cossus*-larvens kitin. Hyfspetsen skrumpnar och hyfen kommer ofta att intaga en abnorm ställning, antingen riktad rakt ut från kitinet eller spiralformigt vriden och hopsnodd i sin distala del. Samma morfologiska förändringar äro ju typiska för hyfer, som utsatts för plötslig torka efter en period av gynnsam tillväxt.

Samma experiment, utfört under andra fuktighetsförhållanden, exempelvis vid 50—60 % relativ fuktighet, ger ett annat resultat. Konidiegroningen sker i ungefär samma takt, men hyferna förmå sprida sig över hela dorsalytan — vid stark konidiefrekvens ge hyferna upphov till en filtliknande beläggning — och söka sig väg till segmentgränser och stigmata utan att förgrena sig. Först här, där fuktigheten är avsevärt högre än på den fritt exponerade kitinhuden, börjar förgreningen och sedermera inväxningen.

Vid ännu högre relativ fuktighet förändras tillväxtbilden väsentligt. I mättad luft växa hyferna oregelbundet, korsa över varandra och förmå genomtränga kitinet även mitt på de starkt kitiniserade ryggplåtarna även om denna form av inväxning sker avsevärt långsammare än inväxningen på andra delar av segmentet. En annan följd av den högre fuktigheten är den starkt stegrade tillväxthastigheten hos de hyfer, som sökt sig väg till tunnare kitin, och den påskyndade genomväxningen.

En sammanställning av fuktighetsundersökningarna ger vid handen att infektionen icke leder till fatal mykos vid fuktighetsgrader under 45 %, i varje fall inte med någon säkerhet. I det studerade materialet utgör antalet mykosfall endast 6 av 74 infektioner vid 30—35 %, 12 av 116 vid 35—42 % och 20 av 57 vid 42—45 %.

Först vid ett relativt fuktighetstal av över 50 % öka hyfernas möjligheter att söka sig väg till lämpliga penetreringspunkter så starkt, att mer än hälften av infektionerna leda till mykos; vid mättad luftfuktighet undgå endast vuxna larver i stadiet närmast före den sista hudömsningen att angripas av parasitsvampen.

Såväl de teoretiska spekulationer, vilka föranledas av försöksresultaten vid laboratorieundersökningarna, som erfarenheterna vid bekämpningsförsök i det fria ge vid handen att *Metarrhizium anisopliae* är en utomordentligt aggressiv parasit på larver av trädödare. Då därjämte utförda prövningar av olika spridningsmetoder visat att inga svårigheter erbjudas vid konidiematerialets applicering i de trägnagande insekternas gångsystem, synes metoden att genom utnyttjande av parasitsvampens gynnsamma livsbetingelser i gångsystemen söka decimera larvfrekvensen kunna vara värd uppmärksamhet. I vårt land uppträder trädödaren (eller vanliga träfjärilen som den också kallas) huvudsakligen som en svår och i allmänhet oåtkomlig skadegörare på prydnadsträd — sälg, pil, poppel, björk, al, ask, bok, ek, lind och alm — och på fruktträd, där den otvivelaktigt kan uppträda som primär skadegörare. Den angriper visserligen endast sällan fullt oskadade träd, men den äggläggningsfärdiga honan lockas till träden t. o. m. av ytterst obetydliga sprickor i barken med åtföljande svag savning. I dessa sprickor, vanligen direkt vid savspegeln, läggas äggen, och de yngre larverna uppehålla sig under hela det första året i barken eller mellan barken och splinten. De tvååriga larverna gnaga sig väg in i veden och utvidga på detta sätt en obetydlig sprickskada till en för hela trädet katastrofal skada, som i regel medför vindbrott. Det torde sålunda kunna anses befogat att räkna trädödaren till de primära skadegörarna och att i syfte att förebygga ytterligare spridning vidtaga speciella åtgärder mot larverna även om det angripna trädet skulle vara dömt till undergång.

Kornmalen, Tinea secalella.

Undersökningar över infektionsgraden hos larver av kornmal ha utförts i betydande omfattning, sedan de orienterande studierna redan hösten 1936 givit positiva resultat. Vid dessa undersökningar har en tydligt markerad skillnad beträffande hyfernas växtsätt hos kornmallarverna kunnat påvisas; medan hyferna hos trädödarelarven vid en relativ fuktighet av 50—65 % växte lång sträcka oförgrenade och utan iakttagbara tecken till inväxning, utbildas hyfen hos kornmallarven omedelbart efter groningen (i likhet med de tidigare påvisade förhållandena hos kvarnmottets larv) till en starkt förgrenad bildning, som mycket snart sänder ut en utlöpare genom kitinet. Den direkta anledningen till detta avvikande växtsätt är svår att säkert fixera, men det är uppenbart att tillväxtbetingelserna under den första och kritiska perioden äro gynnsammare hos kornmallarven. Ett studium i stark förstoring av kornmallarvens hud ger måhända förklaringen till hyfernas snabba och säkra växt. Kitinets yta är hos denna larv, i motsats till förhållandena hos trädödarelarven, tätt besatt med små trubbiga, vid basen grova hår, vid vilkas basala delar hyferna företrädesvis söka sig väg ut över ytan. Det torde kunna antagas att fuktighetsförhållandena omedelbart intill kitinet och mellan dessa tättställda hår äro avsevärt gynnsammare för hyferna, vilket på ett godtagbart sätt skulle kunna förklara iakttagelsen att hyftillväxten icke hämmas ens av extremt torr luft i försökslokalen.

Vid konstlad infektion av halvvuxna larver vid mättad luftfuktighet konstateras regelbundet att konidiernas groning och hyfernas utväxning sker utomordentligt snabbt. Inväxningen sker var som helst på segmenten; ett närmare studium av inväxningspunkterna visar att hyferna icke följa speciella förutbildade stråk genom kitinet. Av särskilt intresse är kitinets ytterst varierande motståndskraft mot det nedbrytande kitinaset, som avsöndras av hyfspetsen. Medan sålunda kitinet på thoracalsegmentens dorsalplåtar genomväxes i trånga, ofta slingrande kanaler, vilka äro karakteristiskt sick-sackformade, erbjuder uppenbarligen kitinet på segmentens ventralsida betydligt mindre motstånd. Här åstadkomma hyferna redan efter ett dygns verksamhet ett stort, väl markerat hålrum, vars diameter kan bli många gånger större än den genomväxande hyfens (fig. 12). Detta hålrum förlänges till en bred och rymlig kanal, som tillåter hyfen att utan svårighet och utan att påvisbart utöva mekaniskt tryck på kavitetens botten följa efter mot hypodermis. Då kanalen är färdig och hyfen sålunda fullföljt genombrottet, utnyttjas samma bräsch ofta av andra hyfer, vilka i regel icke ha den först framträngande hyfens utpräglade förmåga att taga

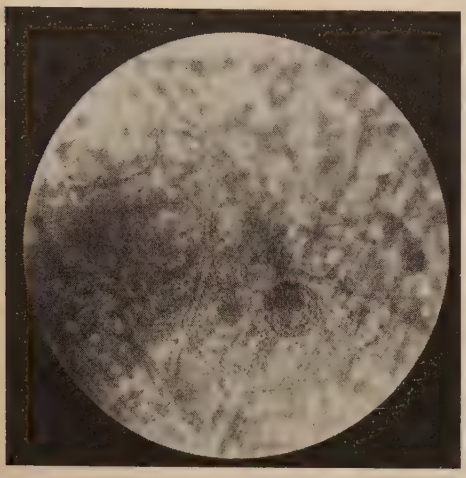


Foto G. Notini.

Fig. 12. Angripet kitin av kornmallarv. På bilden synes penetreringspunkten genom kitinet.

Attacked chitin of grain-moth larva. The figure shows the point of penetration through the chitin.

Foto G. Notini.

Fig. 13. Kitinhud av kornmallarv, 12 tim. efter infektion. Hyferna växa företrädesvis närmast kitinytan.

Chitin integument of grain-moth larva 12 hours after infection. The hyphae grow preferably nearest the surface of the chitin.

till sig färg och vilka dessutom utmärkas av sin mindre diameter och sina längre celler.

Kroppsvätskan hos larven reagerar på i huvudsak liknande sätt som tidigare beskrivits för *Cossus*-larven; en ansamling av leucocyter, vilka hos kornmallarven äro kornrikare, konstateras regelbundet kring hyfspetsarna i infektionens tidigaste skede. Det har emellertid icke lyckats att fastställa någon på snittbilder iakttagbar inverkan av dessa cytofager; hyferna ha banat sig väg vidare till corpus adiposum och bindväven utan att hejdas av kroppsvätskans amöboider.

Inkubationstiden hos halvvuxna larver vid mättad luftfuktighet är mycket kort. Total immunitet har icke iakttagits.

Motsvarande förhållanden hos de vuxna, förpuppningsfärdiga larverna, vilka lämna spannmålen för att spinna in sig i övervintringskokong, äro i viss mån annorlunda. Vid infektion av en äldre larv gro konidierna ut normalt och hyferna tillväxa med ungefär samma hastighet som hos de yngre larverna, men genomträngningen är hämmad. Om en dylik infekterad larv flyttas från sin naturliga plats i spannmålsmagasinet till fuktig kammare, blir den i regel ofelbart genomvuxen och drabbas av *fatal* mykos, vilket visar att infektion skett men icke kunnat fullföljas i den torra magasinsluften. Om larven i stället flyttas till annan plats med samma temperatur- och fuktighetsförhållanden som i spannmålsmagasinet lyckas den i de flesta fall överleva angreppet och genomgå förvandlingen till puppa.

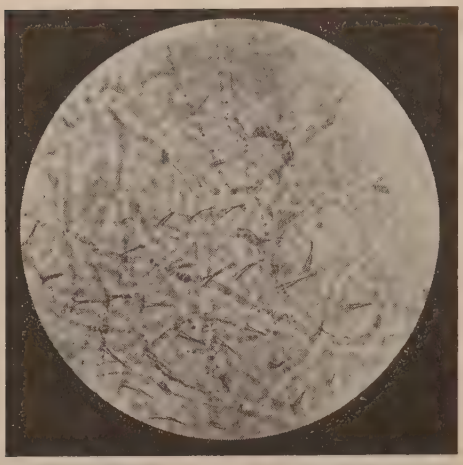


Foto G. Notini.

Fig. 14. Återgångshyfer, stadda i begrepp att bilda konidier.
Retrogressive hyphae on the point of forming conidia.

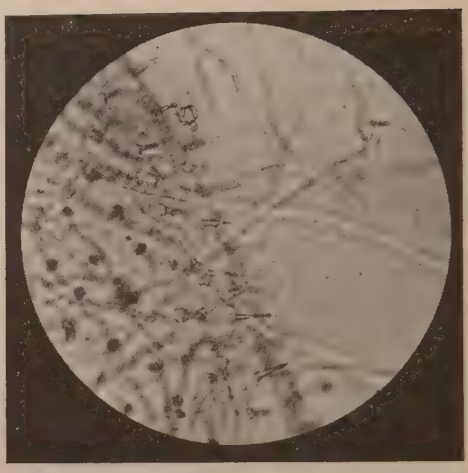


Foto G. Notini.

Fig. 15. Kitin med talrika genombrottsställen. Återgångshyferna äro avsevärt grövre än inväxningshyferna.
Chitin with numerous perforations. The retrogressive hyphae are considerably coarser than the ingrowing hyphae.

Av de redovisade försöksresultaten kunna vi draga den slutsatsen att tidpunkten för infektionen är av utslagsgivande betydelse för utbildandet av en fatal mykos. De tidiga stadierna äro vid mättad luftfuktighet undantagslöst dömda till undergång. Vid lägre fuktighet minskas dödligheten, men ännu vid så låg rel. fuktighet som 45 % konstateras god effekt med en dödlighet av lägst 95 %. Hos de äldre larverna når dödligheten höga värden endast vid maximal fuktighet och t. o. m. då oftast under förutsättning att inverkningstiden blir lång. Vid 45—55 % relativ luftfuktighet minskas antalet *fatala* mykoser till omkring 1/3 av det maximala, ett förhållande av utomordentligt stor betydelse för bedömandet av parasitsvampens värde som biologiskt bekämpningsmedel mot kornmal.

Beträffande resultaten av utförda bekämpningsförsök mot detta skadedjur hänvisas till följande redogörelse av R. Mathlein.

Bekämpningsförsök i laboratoriet. (Av R. Mathlein.)

För bedömande av parasitsvampens eventuella användbarhet mot en inomhusinsekt sådan som kornmalen är givetvis kännedomen om fuktighetsförhållandenas inflytande på dess aktivitet av särskild vikt. Av följande försöksredogörelser häröver framgår, att kornmallarver, som behäftats med konidier, kunna angripas och dödas även vid jämförelsevis låg relativ luftfuktighet.

I ett försök insläpptes 15 halvvuxna kornmallarver i var och en av sex glasskålar med lock av mässingsduk. Filtrerpapperet i botten på tre av skålarna hade svagt bestoftats med *Metarrhizium*-konidier. Bestoftade och obehandlade skålar placerades parvis i kamrar med skilda temperatur- och fuktighetsförhållanden. De flesta larverna spunno inom kort in sig i kokonger på filtrerpapperet. Antalet levande resp. döda larver räknades tid efter annan. Resultatet framgår av tabell 1.

Tabell 1. *Infektionsförsök mot larver av kornmal. Igångsatt 3/11 1939.*

Behandling	Temp. °C.	Luftfukt %	14/11		17/11		28/11		6/12		19/12		9/2	
			lev.	döda	lev.	döda	lev.	döda	lev.	döda	lev.	döda	lev.	döda
Infekt.	26	75	1	14	0	15	—	—	—	—	—	—	—	—
Ej inf.	26	75	13	2	13	2	10	5	—	—	—	—	—	—
Infekt.	19	75	7	8	5	10	3	12	3	12	2	13	0	15
Ej inf.	19	75	15	0	15	0	14	1	14	1	10	5	9	6
Infekt.	19	50—60	7	8	6	9	1	14	0	15	—	—	—	—
Ej inf.	19	50—60	15	0	15	0	14	1	7	8	—	—	—	—

Som synes dogo larverna i de med konidier bestoftade skålarna inom ganska kort tid även vid en jämförelsevis låg luftfuktighet. Alla dessa larver, på något enstaka undantag när, voro, efter blott ett par dagars efterföljande förvaring i fuktig kammare, fullständigt övertäckta av parasitsvampens mycel; detta framväxte ej, så länge larverna bibehöllos vid den lägre luftfuktigheten. Att luftfuktigheten i och för sig föga påverkar konidiernas angreppskraft gentemot infekterade larver, framgår även av följande försök, som utfördes vid rumstemperatur och en relativ luftfuktighet av endast 45—50 %. Därvid placerades 12 ännu ej fullvuxna larver i ett kärl med konidiebestoftat papper och 12 i ett obehandlat kärl. Samtliga förstnämnda larver voro efter fyra dygn påtagligt kraftlösa och oförmögna att krypa samt dogo inom 9 dygn, räknat från försökets början, under det att samtliga kontrolldjur utom ett fortlevde och voro fullt vitala ännu efter tre veckor, då observationerna avbrötos. Vid överföring av de 12 döda larverna till fuktig kammare befanns det, att samtliga redan ett dygn efteråt voro helt övervuxna av parasitsvampens mycel.

Slutligen skall återges resultatet av ett försök med inblandning av konidiematerial i råg, som angripits av kornmallarver, vilka vid försökets igångsättande (eftersommaren) voro fullvuxna. Rågen, vars vattenhalt var 15,5—16 %, uppdelades i fem olika poster om vardera 1 kg. I två av dessa in-

Foto G. Notini.

Fig. 16. Kornmal-larver, som angripits av grönmykos. Den högra larven är helt omvuxen av svamptrådar.

Grain-moth larvae attacked by green muscardine. The right larva is completely enclosed in hyphae.

blandades 0,2 gram rent konidiematerial och i två andra 0,2 gram konidier, som uppblandats med 2 gram magnesiumoxid som »utdrygningsmedel». I den ena av såväl förstnämnda som sistnämnda poster hade rågen omedelbart före inblandningen av konidiematerialet svagt fuktats. Den femte posten var obehandlad kontroll. Samtliga poster förvarades därefter i täckta glasburkar vid rumstemperatur.

Efter 50 dagar avslutades försöket, varvid från varje prov uttogs och granskades ett 30-tal larver ur de kärnklumpar, vari de lågo inspunna. Antalet därvid påträffade levande och döda larver framgår av tab. 2.

Tabell 2. *Kornmallarver i konidiebehandlad råg; 50 dygns inverkningstid.*

Prov nr	Behandling	Antal uttagna larver	Därav döda
1.	Konidier, torra	33	12 = 36 %
2.	» torra + MgO	32	11 = 34 %
3.	» fuktade	32	10 = 31 %
4.	» fuktade + MgO	33	9 = 28 %
5.	Obehandlat	36	0 = 0 %

Som synes voro i de med konidier behandlade rågproverna 28—36 % av larverna döda, under det att samtliga larver i kontrollen levde. Någon säker skillnad i dödligheten hos larverna i de olika, behandlade proverna förefanns tydligen icke. Alla döda larver voro vid påträffandet torra och hårda. De överfördes omedelbart till petriskålar med fuktat filtrerpapper, och redan ett dygn efteråt begynte parasitsvampens mycel att tydligt framträda på samtliga larver. Av de levande larverna, vilka likaledes förvarades i fuktig kammare, angreps ingen under den 7 dygn långa efterkontrollperioden.

En dödlighet hos larverna på omkring 30 % genom angrepp av *Metarrhizium* får anses som ett ganska tillfredsställande resultat i nyssnämnda försök, med hänsyn till att försöksdjuren i detta fall voro fullvuxna och i sina spinnrör i kärnklumparna stationära larver, vilka avslutat sitt näringsupptagande.

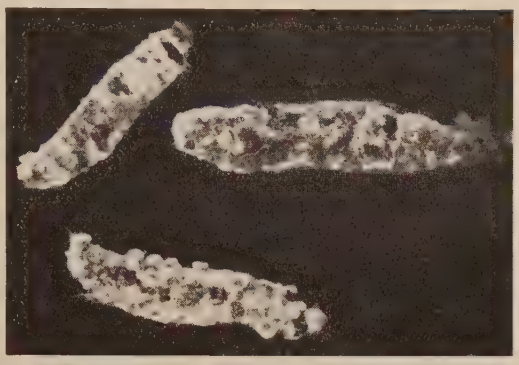


Foto G. Notini.

Fig. 17. Kornmallarver med fullt utbildad grönmykos.
Grain-moth larvae with fully developed green muscardine.

Bekämpningsförsök i spannmålsmagasin (Av R. Mathlein.)

På grund av de i viss mån positiva utslag, som vid laboratorieförsöken erhållits beträffande möjligheterna att utnyttja *Metarrhizium*-svampen mot kornmal, utfördes somrarna 1942 och 1943 en del praktiska bekämpningsförsök, om ock i mindre skala. Dessa ägde rum i spannmålsmagasin, varest kornmal sedan många år uppträdde i riklig mängd.

A. Inblandning av konidiematerial i spannmål.

Den 11 juli 1942 utlades ett försök i ett spannmålsmagasin med inneliggande lager av råg, som angripits av kornmal. Det erforderliga konidiematerialet härstammade från en *Metarrhizium*-odling på havre i koniska kulturkolvar. Ympningen hade verkställts den 12 maj, och kolvarna tömdes den 4 juli, varefter innehållet utbreddes till torkning ett par dagar, innan de i ymnig mängd utvecklade konidierna frånsiktades. För att underlätta en jämn utspridning av det vid minsta luftdrag »dammande» konidiematerialet blandades detta med omkring tiodubbla mängden vetemjöl.

Före försökets utläggande kontrollerades konidiematerialets virulens genom infektionsförsök på larver av klädesmal, vilka snabbt angrepos och dödades av parasitsvampen.

Av det i magasinet inneliggande rågpartiet uppvägdes tre poster om vardera 200 kg, vilka utbreddes i c:a 15 cm tjocka lager på magasinsgolvet. I två av dessa partier inblandades omsorgsfullt konidiematerial i en mängd, motsvarande 2,5 resp. 1 gram rena konidier pr 100 kg råg. Den tredje posten behandlades icke. Därjämte ifylldes 8 papperssäckar med vardera 20 kg råg, varav de 6 med konidieinblandning, motsvarande från 10 till 1 gram pr 100 kg råg. Säckarna förvarades öppna. Vattenhalten hos rågen var enligt samma dag utförd provtagning 17 %. Rågen företedde ännu

inga synliga tecken på angrepp av kornmallarver men innehöll rikligt med unga i kärnorna inborrade larver.

Omedelbart efter det att konidierna inblandats uttogos ur de olika rågposterna prover, vilka sedan förvarades vid växtskyddsanstalten i glasburar vid rumstemperatur men vid olika luftfuktighet: 85, 75 och 70 %. Under sommarens lopp begynte rågen i samtliga prover att »klumpa sig» som en följd av larvernas verksamhet, och vid undersökning den 31 augusti funnos inga skillnader i larvfrekvensen mellan behandlade och obehandlade prover. Samtliga larver voro fullt vitala. Något angrepp av *Metarrhizium* uppkom ej heller vid överföring till fuktig kammare av larver och råg från de *Metarrhizium*-infekterade proverna. Det negativa resultatet av försöket bekräftades vid granskning av spannmålspartierna i magasinet i september.

Två månader efter försökets utläggande prövades det överblivna konidiematerialet laboratoriemässigt på kornmallarver, varvid befanns, att det mjölblandade konidiematerialet var verkningslöst, under det att infektion med rena konidier av samma ålder och ursprung orsakade larvernas död i »grönmykos». Kontrollodling på vanlig näringsagar bekräftade, att de mjölblandade konidierna till största delen förlorat sin grobarhet. Detta syntes, av bekämpningsförsökets utgång att döma, ha skett redan kort tid efter materialets iordningsställande och inblandning i spannmålen.

Det föreföll sålunda som om användandet av mjöl som utdrygningsmaterial skulle ha på något sätt förorsakat konidiernas död. Emellertid visade sig en sedermera på samma sätt iordninggjord mjöl-konidieblandning kunna bibehålla sin fulla grobarhet och angreppsförmåga på kornmallarver i fulla två månader. Hypotesen att de i bekämpningsförsöket använda konidierna grott på grund av mjölinblandningen och därigenom förlorat sin aktivitet gentemot larverna kunde lätt vederläggas genom mikroskopisk undersökning. Frågan om anledningen till den förstörda grobarheten har tills vidare lämnats öppen.

Ett ytterligare inblandningsförsök med konidier i spannmål utfördes sommaren 1943. Denna gång prövades dels rent konidiematerial, dels konidier, uppblandade med tredubbla viktsmängden kiselgur (»Naaki»). Det överblivna materialet prövades under sommarens lopp upprepade gånger laboratoriemässigt på kornmallarver med genomgående positivt resultat. Försöket utlades i magasinet den 16 juli. Av det rena konidiematerialet inblandades 4 gram i 200 kg råg och av det uppblandade materialet 12 gram i likaledes 200 kg råg. Rågen, vars vattenhalt var 15,9 %, innehöll rikliga mängder av unga kornmallarver, inborrade i kärnorna.

Detta andra försök gav lika negativt resultat som det förut beskrivna. Såväl i behandlade som obehandlade rågpartier utvecklades larverna normalt, och skadegörelsen var densamma i båda fallen. På eftersommaren

Foto G. Notini.

Fig. 18. Angripna och dödade kornmallarver, som förvandlats till mumieliknande kroppar.

Attacked and killed grain-moth larvae, transformed into mummy-like bodies.

insamlades talrika larver från de olika rågposterna och överfördes i fuktig kammare, varvid blott någon enstaka larv från de behandlade posterna angreps och dödades av svampen. Det kunde sålunda anses fastslaget, att ifrågavarande användningssätt för parasitsvampen icke kan tillämpas i praktiskt bekämpningssyfte.

B. Besprutning med konidiematerial.

Hösten 1942 utfördes i ett spannmålsmagasin ett försök, som gick ut på att genom vattenbesprutning (medelst fruktträdsspruta) av väggar, golv o. s. v., åtföljd av bestoftning med *Metarrhizium*-konidier, infektera de ur spannmålen utvandrande, övervintringsfärdiga kornmallarverna. Försöket verkställdes den 18/9, varefter förnyad fuktning genom vattenbesprutning utfördes den 21/9, 25/9, 12/10 och 16/10.

När konidierna den 18/9 utspredos, hade larvernas utvandring ur sädeshögarna ännu ej börjat men pågick vid undersökning den 12/10, ehuru ännu ej i större skala. Vid sistnämnda tillfälle insamlades från vägg- och golvytorna ett antal kringkrypande larver, vilka sedan förvarades i en serie petriskålar vid rumstemperatur och mättad fuktighet. Av de sammanlagt 60 larverna voro efter 9 dygn 47 och efter 16 dygn 59 döda i grönmykos.

Den 11 december insamlades i magasinet ånyo larver, vilka samtliga voro inspunna i sina övervintringskokonger. Alla påträffade larver voro fullt vitala. Av de insamlade larverna uttogos 60 ur kokongerna och förvarades i mättad fuktighet vid rumstemperatur. Efter 9 dygn voro 39 larver

och efter 17 dygn 52 larver döda i grönmykos. Resten av det i magasinet insamlade larvmaterialet, bestående av orörda kokonger i träbitar, fördelades på olika fack i bryggtermostat vid temperaturer, dels av — 1° à — 2° och dels av + 5° à 10° C. Tid efter annan under vintern och våren 1943 uttogos prover av träbitarna och överfördes till rumstemperatur, en del direkt, en del under långsam temperaturstegring under några veckors tid. Omkring 30 % av befintliga larver i de olika proverna förpuppades och gåvo upphov till fullbildade malar. Övriga c:a 70 % av larverna voro vid undersökning av proverna döda och torra. Stickprov av dessa, vilka snittades och undersöktes mikroskopiskt, ådagalade att 70 % av dem voro genomväxta med mycel av parasitsvampen. I spannmålsmagasinet begynte malar att framkomma i förra hälften av juni 1943; frekvensen var påtagligt lägre än under de närmast föregående somrarna men dock tillräcklig för att framkalla skador på inneliggande spannmålslager, om ock ej av samma omfattning som under tidigare år.

Så mycket kan genom det ovan relaterade bekämpningsförsöket fastslås, att man på ett enkelt sätt kan få praktiskt taget samtliga övervintrande kornmallarver i ett magasin behäftade med konidier av parasitsvampen. Detta är dock ej liktydigt med undergång för hela eller ens större delen av larvpopulationen. I ifrågavarande bekämpningsförsök kunde man dock räkna med att parasiten decimerat larvpopulationen med omkring 40 %. Som resultat av ett orienterande försök med »biologisk bekämpning» av detta slag bör denna siffra anses tämligen tillfredsställande. Den möjligheten är ej utesluten, att man genom tillämpande av rationellare teknik och metodik kan höja effekten avsevärt utöver den, som hittills ernåtts. Påpekas bör även, att kornmallarvernas utveckling ävensom tidpunkten för deras utvandring ur spannmålslagren i och för övervintring var ovanligt sen under det år, då ifrågavarande bekämpningsförsök utfördes. Parasitsvampen blev givetvis missgynnad i sin utveckling på grund av den sena utspridningstiden och den därav följande låga temperaturen.

Sädesbroddflyet, Agrotis segetum.

En orienterande undersökning av sädesbroddflylarvens mottaglighet för angrepp av *Metarrhizium anisopliae*, utförd sommaren 1938, gav starkt positivt resultat på så kort tid att frågan om svampens aggressivitet mot de vanligaste skadegörande jordflylarverna upptogs till närmare studium påföljande år. Vid de inledande prövningarna användes en speciell odlingskammare, som medgav mättad luftfuktighet utan risk för de ofta svårhanterliga larvernas undergång genom kvävning. Denna kammare bestod av en vanlig flat petriskål, i vars botten en gipsplatta anbragts. Gipsen

färgades svart med kimrök för att studiet av hyferna lättare skulle kunna utföras under preparerlupp. Vid infektionen anbragtes ett lager konidier eller en vattensuspension av konidier över gipsytan; i det förstnämnda fallet tillsattes en ringa mängd destillerat vatten. Metoden har den fördelen framför användandet av filtrerpapper, att försöksdjuren dels ej fuktas av underlagets vattenöverskott, dels förhindras att gnaga av det sporhaltiga materialet. Skålen kan efter försökets slut steriliseras i termostat vid 225° utan att anordningarna förstöras.

Upprepade försök med infektion av larver av sädesbroddflyet i gipsskålar vid 100 % relativ luftfuktighet ha visat, att svampen mycket lätt genomväxer kitinet och orsakar mykos. Även försök med larver i jord, som överpudrats med ett ytterst tunt lager konidier, ha givit god effekt. Därest larverna verkligen äro mottagliga, måste ju även betingelserna för svampens tillväxt och angrepp på larverna bedömas som synnerligen gynnsamma, då värddjurens undangömda levnadssätt i jorden gör infektionstekniken enkel och skyddar svampen mot uttorkning under de första kritiska stadierna. Resultaten av de orienterande studierna motiverade försök i större skala på friland, och i det följande skall en kortfattad redogörelse för utförda prövningar av parasitens användbarhet mot sädesbroddflylarver lämnas.

I början av maj månad 1941 inträffade en synnerligen häftig härjning av sädesbroddflylarver på Adelsö i Mälaren. Larverna hade kastat sig över flera olika kulturer i kallbänk; bland annat hade stora salufärdiga kulturer av sallat och morötter förstörts till 50—60 %, 30 fönster grovbladig spenat av mangoldtyp helt förstörts liksom 100 bänkfönster rädisor, medan omkring 200 fönster med samma växt ödelagts till 75 %. Skadedjuren hade vidare ätit rent 60 fönster palsternacka, 90 fönster höstsådda morötter och c:a 150 fönster decimeterhög dill och till hälften eller mera skadat 300 fönster utskolade vitkålplantor och 30 fönster nysådda brytbönor. Vid närmare undersökning på platsen av antalet larver visade det sig att i genomsnitt 122 larver kunde plockas för hand under varje fönster utan att jordens ytlager sållades. Det var sålunda en utomordentligt stark invasion av larver i kallbänkgården och detta lägliga tillfälle utnyttjades omedelbart för ett jämförande försök med arsenikmedel, pyretrin och konidier av *Metarrhizium*.

För försöket avsattes 300 fönster dill och 180 fönster rädisor, vilka ännu icke företedde tecken på allvarlig skadegörelse och vilka samtliga pudrades med rikliga mängder arsenikpuder. Parallellt härmed behandlades 60 fönster till hälften utvuxen sallad med ett pyretrinmedel (Pyretin), som visat sig användbart mot flera andra skadegörare, och lika många fönster med samma växt med en konidiesuspension i vatten. För kontroll lämnades ett mindre antal fönster med flera skilda kulturer obehandlade. Kontrollen

av försöket överlämnades till försöksvärden, trädgårdsmästare Karl Eriksson, som åtagit sig uppdraget att varje dag räkna igenom ett antal parceller och insända materialet för laboratoriekontroll. Redan efter två dagar kunde denne meddela att »det ser ut som om svampen gör den mesta nyttan av de prövade medlen; i de med svampen besprutade fönstren har jag funnit åtskilliga döda larver. I de fönster, som vi pudrade med arsenik, tycks angreppet ha blivit tillbakasatt, men några döda larver ha ej påträffats. Pyretrumgiftet synes ej göra någon verkan.»

Vid en noggrann inventering efter ytterligare några dagar kunde de lämnade uppgifterna bekräftas. I de pyretrinbehandlade parcellerna fortsatte skadegörelsen och larverna hade lika stor vitalitet som i kontrollerna. I arsenikparcellerna kunde emellertid ett tydligt resultat iakttagas, i det att icke mindre än 682 döda larver anträffades av totalt 7.115, d. v. s. nära 10 %. En stor del av de ännu levande larverna uppvisade dock tydliga symptom på trögheť, ett karakteristiskt tecken till begynnande arsenikförgiftning, varför de transporterades till insektarium för kläckning. Här visade de sig senare vara så allvarligt påverkade av arseniken att dödligheten steg till inalles 22,8 %. Undersökningen av larvfrekvensen i de konidiebehandlade parcellerna gav ett överraskande resultat: icke mindre än 1.653 döda larver anträffades, vartill kom ett begränsat antal tröga, men fortfarande reagerande exemplar. Hela det anträffade larvmaterialet i de 30 undersökta parcellerna uppgick till 3.998 st. Den konstaterade dödligheten låg sålunda redan efter fyra dagar så högt som 41 %.

Vid en förnyad kontroll två veckor efter behandlingen konstaterades en stark minskning av larvfrekvensen i de ännu ej avräknade konidiebehandlade parcellerna. En mängd larvmumier kunde sållas fram och antalet överlevande larver hade nedgått till 282 i tio analyserade parceller trots att tiden för larvernas förpuppning ännu ej inträtt. Den totala effekten av ingreppet kunde således uppskattas till c:a 80 %.

Samma år under juni månad iakttogs en stark men lokalt begränsad massförökning av sädesbroddflylarver på trädgårdsland vid Ahlby säteri i Södermanland. Larverna hade uppenbarligen övervintrat i kanten av ett fält, där föregående år odlats palsternackor; från kantzonen vandrade de äldre larverna ut över angränsande mark, som besåtts med morötter. Skadegörelsen var avsevärd på de unga morotplantorna och kunde utan svårighet iakttagas på stort avstånd. Kring mitten av månaden utlades ett bekämpningsförsök på så sätt, att i ett 4 meter brett bälte utanför den egentliga skadezonen vissa avsnitt besprutades med konidiesuspension i vatten; andra, 5 meter långa avsnitt, besprutades med enbart vatten. Vid denna tid hade de oskadade plantorna vuxit ut så långt att marken till större delen beskuggades av plantorna, varigenom markytan hölls fuktig.

Efter 6 dagar gjordes en provinsamling av larver inom behandlade och

obehandlade avsnitt. Sammanlagt anträffades på 13 kvadratmeter behandlad mark 43 levande och 366 paralyserade larver, medan på lika stor yta obehandlad mark motsvarande siffror voro resp. 672 och 13. Här hade sålunda översprutningen med konidier orsakat en utomordentligt hög dödlighet (de paralyserade larverna visade sig vid efterkontroll samtliga vara så svårt angripna, att de dogo inom ytterligare några dagar).

Efter 15 dagar, då angreppet hejdats och skadegörelsen begränsats till området utanför bältet, kunde endast 6 larver anträffas trots noggrann genomgång av de tidigare ej undersökta delarna av försöksmarken. Av oförklarlig anledning kunde inga mumier påträffas i marken; möjligt är att larverna efter mykosens utbrott sönderdelats ytterst snabbt av förruttnelsebakterier, ett förhållande, som iakttagits i kärlförsök i laboratoriet.

Av speciellt intresse är iakttagelsen att skadedjurens vidare framträngande i fältet i stort sett helt avstannade efter försökets utläggande. Endast vid ett kontrollparti av bältet inträffade ytterligare spridning, som emellertid begränsades till en sträcka av halvannan meter.

Påföljande år gjordes en stickprovsanalys dels av larvfrekvensen i jorden och dels av diasporhalten*; den då konstaterade frånvaron av sädesbroddflylarver kunde visserligen tänkas vara betingad av helt andra faktorer, men det förhållandet, att jorden vid ympningar på platta visade sig innehålla rikligt med diasporer ger måhända anledning att antaga att *Metarrhizium* väsentligt bidragit till skadedjurens fullständiga försvinnande.

Kålflyet, Polia oleracea, och grönsaksflyet, Barathra brassicae.

Den fortsatta prövningen av *Metarrhizium* som bekämpningsmedel mot jordflylarver omfattade även studier av infektionsgraden hos larver av grönsaksflyet och kålflyet, två svåra skadegörare på kålväxter. De orienterande infektionsförsöken på gipsplatta medförde total effekt, men frilandsförsöken gåvo icke entydiga resultat.

Hyfernas inväxning vid mättad luftfuktighet sker vanligen efter kort tid och larvens hud synes icke äga verksamma skyddsegenskaper mot infektion, därest denna drabbar larven kort efter ett hudbyte. Även vid lägre luftfuktighet växer hyfen obehindrat igenom kitinet var som helst på segmentet och söker sig in i organen. Det är emellertid påtagligt att inväxningen i högre grad än hos sädesbroddflylarven är beroende av tidpunkten för konidiernas anbringande på larven; nära 90 % av sådana larver, som infekterats med konidier strax före hudbyte eller förpuppning, ha visat total immunitet, utan tvivel orsakad av hyfernas oförmåga att genomtränga

* Diaspor (Sernander 1927) användes här som sammanfattande benämning på konidier och hyffragment, med vilka svampen kan spridas.

det gamla, vätskefattiga och hårda kitinet. Jämförande undersökningar av hyfernas reaktion gentemot larvkitin av skilda typer och åldersgrupper ha visat att det äldre kitinet är mycket motståndskraftigt mot kitinaset. Dessa undersökningar ha utförts med 6 olikåldriga kitinprov, vilka befriats från andra organiska ämnen genom kokning i 4 % kalilut och därefter tvättats och placerats i odlingskolvar med konidiesuspension i destillerat vatten. Det yngre kitosanet sönderdelades mycket snart — medan de två äldsta proverna först efter 23 dygns inverkan av hyferna nådde ett upplösningsstadium, som kunde jämföras med det färska kitinets.

Med ledning av vår kännedom om grönsaksfly- och kålflylarvernas levnadssätt kunna vi konstatera, att betingelserna för infektion äro synnerligen skiftande hos de olika utvecklingsstadierna. De unga larverna, som likt andra jordflylarver mestadels leva i jorden under dagens ljusa timmar och som uppsöka näringsväxten endast nattetid, borde ju teoretiskt vara mera lättåtkomliga för infektion än de äldre stadierna, vilka regelbundet leva inuti växtdelarna och före förpuppningen endast undantagsvis uppenbara sig utanför näringsväxten. Under den tid, då larven genomlöper sina sista utvecklingsstadier, vistas den emellertid i en miljö, som måste vara särskilt gynnsam för parasitsvampens verksamhet, nämligen i gångar i exempelvis vitkålshuvud och blomkål, där fuktighetsförhållandena icke kunna lägga avgörande hinder i vägen för infektion. Enligt dessa teoretiska överväganden borde både de yngre och de äldre larverna lätt kunna oskadliggöras genom utspridning av konidier på marken under försommaren eller på kålplantorna vid tiden för knytningen. Försök på friland ha dock visat, att metoden icke kan tillämpas mot äldre larver, men väl mot yngre; de förra undgå angreppet, men de senare infekteras i stor utsträckning, innan de hunnit vandra upp för mera permanent vistelse i näringsväxten.

Försök med bekämpning av grönsaksflylarver på blomkål ha utförts vid Vittskövle i Skåne och vid Röd i Bohuslän; vid det förstnämnda försöket, som utlades sedan skadegörelse konstaterats på mer än halvutvecklade vitkålshuvuden, erhölls rent negativt resultat, trots att konidiesuspensionen vattnades ytterst rikligt över plantorna. Bekämpningsförsöket vid Röd i Bohuslän utlades redan på våren, sedan det konstaterats, att mellankulturer av sallat svårt skadats av dessa larver. Behandlingen med konidiesuspension utfördes enligt radmetoden med tre obehandlade rader mellan varje bevattnad rad. Vid kontroll av försöket vid tiden för blomhuvudenas ansättning kunde inga skillnader i larvfrekvens eller skador iakttagas, men vid slutanalys successivt under skördandet erhölls fullt tydlig skillnad i skadefrekvens med 24 % skadade blomkålshuvuden i kontrollraderna — skadorna voro mycket ojämnt fördelade — mot 3 % förstörda eller osäljbara huvuden i de behandlade raderna. Ett stort antal paralyserade larver

jämte ett fåtal döda larver och larvfragment anträffades speciellt vid de båda yttersta försöksraderna, samtliga med tydliga symptom på grönmykos. En fullständig analys av materialet förhindrades av en formlig invasion av en jordlöpare, *Procrustes coriaceus*, vars larver och imagines till stor del livnärde sig av paralyserade eller döda flylarver utan att själva drabbas av mykos.

Orienterande undersökningar över användbarheten av grönmykos mot grönsaksflylarver i växthus ha hittills icke givit tillfredsställande resultat; troligen har den höga temperatur, som varit rådande vid försökstillfällena, förhindrat tillväxten. Dessa undersökningar äro emellertid ännu ej avslutade.

Bekämpningsförsök på friland mot larver av kålfly ha på grund av brist på lämplig försöksmark endast kunnat utläggas på en lokal, Experimentalfältet, under juli 1942. Vid detta försök, som avsåg att utröna angreppsgraden hos unga larver i en vitkålsodling, konstaterades tillfredsställande effekt med 68 % dödlighet hos hela larvpopulationen — den avgjort högsta dödligheten iakttogs hos de yngsta av dessa larver.

Ytterligare ett försök har utförts. Ett inrapporterat fall av massförekomst av kålflylarver på tomatodling under glas i Tungelsta utnyttjades sommaren 1940 för fortsatt prövning av *Metarrhizium*. Konidierna spredos enligt den »våta» metoden över tomatlavarna, där rikligt med larver kunde hopsamlas i jordens ytlager. Dagen efter konidiespridningen kunde en synnerligen stark effekt konstateras i det att sammanlagt 544 larver anträffades liggande på jordytan ur stånd att aktivt förflytta sig till sina vanliga gömställen. Dessa larver, som transporterades till laboratoriet för kontroll, föllo samtliga offer för typisk mykos inom 7 dygn; hela larvmaterialet tillhörde de första utvecklingsstadierna. Denna snabba effekt, vartill ett parallellfall iakttagits vid försök med sädesbroddflylarver, har icke kunnat förklaras på ett fullt tillfredsställande sätt. I båda fallen ha betingelserna i två väsentliga avseenden varit specifika: hög temperatur och mättad luftfuktighet. Det ligger måhända nära till hands att antaga att redan konidiernas groning under dessa omständigheter kan orsaka förgiftning av larven innan hyferna hunnit genomtränga kitinet. Ett stöd för detta antagande utgör det konstaterade förhållandet att larvernas munhåla och framtarm (den ektodermala delen) voro starkt konidiehaltiga och att dessa konidier, liksom de på kitinhuden befintliga, svällt och börjat sin groning. — Vid fortsatta analyser anträffades ytterligare ett stort antal svampangripna larver, men det måste framhållas att mer än 30 % av larverna visade sig oemottagliga för angrepp. Skadegörelsen minskade emellertid starkt och kulturerna gåvo god avkastning.

I detta sammanhang må resultatet av ett enstaka försök mot larver av nattflyet *Trigonophora meticulosa* omnämnas. På ett material av halv-

vuxna larver av denna eljest sällsynta art, som tillfälligtvis massförökats i växthus som skadedjur på krysantemum, utfördes under augusti 1941 en serie infektionsförsök, varvid de unga larverna i det mörkare tredje utvecklingsstadiet undantagslöst drabbades av mykos medan de ljusare, äldre larverna icke infekterades. De immuna larverna (sammanlagt c:a 40 % av hela populationen), förpuppades i vanlig ordning och kläcktes i insektarium, ett fåtal samma höst, de flesta påföljande vår.

Grässkadande jordflyn, Agrotis spp.

Särskilt intresse erbjuda undersökningar över angreppsgraden av *Metarrhizium* på larver av grässkadande jordflyn. Dessa skadedjur, som stundom uppträda i oerhörd mängd och som därvid fullständigt kalåta vårsädesfält och gräsvallar, äro synnerligen svåra att bekämpa på grund av arealernas storlek och insekternas vandringar.

Ett sådant massuppträdande inträffade i maj månad 1943 i Västerviktstrakten, där fält med havre, vårvete och vallgräs totalt ödelagts av halvvuxna larver av jordflyn. Larverna tillhörde av allt att döma arterna *Agrotis nigricans* och *Agrotis tritici*, men kunde icke säkert bestämmas till arten, då de i samtliga kläckningsförsök dukade under av olika orsaker. Försök gjordes att genom utläggande av spärrområden, utröna parasitsvampens förmåga att hejda den utbrutna kalamiteten. Enligt Ahlberg (1943) utfördes försöket på följande sätt.

Den 18 maj undersöktes larvernas uppträdande på en av de svårast angripna brukningsdelarna, Sandviken i Helgsjö. Larverna hade spritt sig från ett fält med midsommarråg, som föregående år såtts efter misslyckad första års vall. Rågen stod i ax, men larverna hade rensat fältet från ogräs och sedan kastat sig över tillsammans omkring ett tunnland havre, vårvete och vall, som helt ödelagts (se kartskiss). Härjningen var så fullständig, att inte ett grönt strå lämnats på den areal, som larverna gått över. Vid den gjorda undersökningen fastställdes, att larverna redan överskridit ett anlagt fångstdike och spritt sig in i ett vårvetefält. Som försöksmark utvaldes parceller i havre och första års vall väster om den på kartskissen markerade nord-sydgående vägen, där fångstdike ej anlagts. En frekvensräkning utmed angreppets front på tolv parceller om vardera ¼ kvadratmeter gav följande värden, redovisade efter parcellernas läge från väster till öster: 254, 335, 49, 126, 267, 260, 192, 79, 67, 17, 637, 205 st. larver. Om vi bortse från parcellerna öster om markvägen, vilka icke beröras av försöket, ger beräkningen ett medelvärde av mer än 600 larver per kvadratmeter, en utomordentligt stark invasion.

I syfte att utröna angreppsgraden av grönmykos på dessa larver utstakades en 100 kvadratmeter stor försöksruta nära angreppsfronten men be-

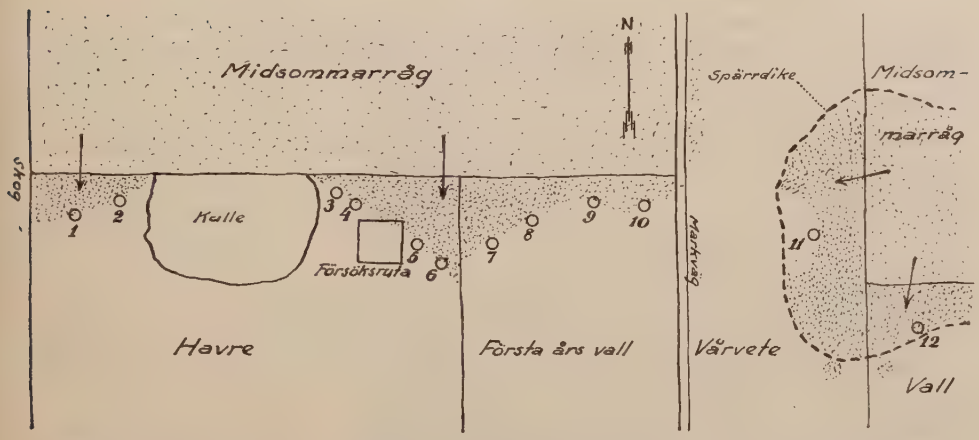


Fig. 19. Kartskiss över terrängen vid bekämpningsförsök med jordflylarver.
Sketch map of the ground in combating experiments with garden-dart larvae.

lägen på den ännu tämligen orörda marken. Rutan överpudrades med en blandning av 99,5 % kiselgur och 0,5 % konidier i en dosering av omkring 5 gram per kvadratmeter. Vid försökstillfället rådde stark blåst, som medförde att konidiematerialet blev synnerligen ojämnt fördelat över försöksmarken, samtidigt som ihållande torka gjort jorden olämplig för konidiernas vidare utveckling.

Förutom försöksrutan överpudrades även spärrdikets nedrasade kanter och ett meterbrett bälte utmed angreppsfronten.

Den 20 maj togs ett prov av 167 larver från försöksrutan; efter 12 dagars förlopp hade 81 % av larverna dött i tydliga symptom på mykos. I ett annat prov, bestående av 224 larver från samma parcell, dogo 44 % under de närmast följande 6 dagarna i mykos. Konidiebildningen i de döda och genomvuxna larverna blev emellertid undertryckt av en efterföljande kadaverinfektion av förruttnelsebakterier.

Enligt rapport från jordbrukskonsulenten i länet den 2 juni hade härjningen avtagit starkt efter anläggandet av spärrbältet med konidiematerial, ett förhållande, som AHLBERG kunde bekräfta vid undersökning i början av juli månad. Härjningen hade stannat »praktiskt taget överallt inom den meterbreda zon, inom vilken bepudringen utförts».

Särskild uppmärksamhet tilldrager sig en iakttagelse av AHLBERG angående mykosens praktiska konsekvenser i föreliggande försök. Sålunda meddelar han, att samtliga anträffade larver — både mykossmittade och friska — efter någon tid angripits av bakterier, vilka medfört, att kadavren sönderfallit snabbt under avgivande av en utomordentligt stark och karakteristisk lukt. Huruvida det verkligen rört sig om bakterier eller om andra organismer synes emellertid icke vara fastställt, ej heller om dödsorsaken

kunnat hänföras till angrepp av dessa organismer. Det torde kunna framhållas, att även fullt friska larver, som dödas genom alltför stark fuktighet (kvävning) eller genom svält, angripas av förruttnelsebakterier, vilka ge upphov till alldeles likartade symptom. Möjligheten att kontrolldjuren på grund av den långa observationstiden i laboratoriet dukat under för ogynnsamma yttre faktorer och därefter, i likhet med de svampdödade exemplaren, infekterats med sönderdelande bakterier och restlöst förintats, synes sålunda icke böra lämnas utan avseende. Av intresse är AHLBERGS uttalade slutsats att larverna, som genom mykosen tvingats inställa sitt foderupptagande lång tid innan döden inträtt, eliminerats som skadegörare på ett tidigt stadium, och att mykosen otvivelaktigt gjort åsyftad verkan oavsett en eventuellt efterföljande infektion av bakterier eller andra mikroorganismer.

Gräsflyet, Cerapteryx graminis.

De nämnda grässkadande jordflylarverna utgöra emellertid icke de enda vallskadegörarna bland nattflyna; vida mer förhärjande uppträda larverna av gräsflyet (*Cerapteryx graminis*), de s. k. gräsmaskarna. Tanken att utnyttja *Metarrhizium* som biologiskt medel mot även dessa massuppträdande markskadegörare ligger ju nära till hands och orienterande studier ha därför utförts i laboratoriet och i fältförsök.

De inledande infektionerna på gipsplatta gåvo lovande resultat i det att samtliga försöksdjur vid ett 30-tal delförsök drabbades av fatal mykos inom 5 dagar. De prövningar av metoden på fritt land, som utförts, ha emellertid på grund av säregna försöksbetingelser icke givit säkra resultat. Vid två tillfällen har infektionen utförts några dagar innan djuren inställt sitt fodersökande för att övergå i puppa; resultaten av dessa båda försök ha givetvis blivit rent negativa. Vid ett enda försök har underrättelse ingått i så god tid att åtgärder kunnat vidtagas mot de halvvuxna larverna. Härjningen hade iakttagits vid en av Uddeholmsgårdarna i Västmanland, där larverna spritt sig från en sankäng med tuvtåtel in över en permanent betesvall, som på alla håll var omgiven av barrblandskog på morän. Larverna hade ursprungligen vandrat ut solfjäderformigt från sankmarken och under sin framryckning helt ödelagt betet, men hade vid tiden för rapporten redan hunnit sprida sig ända ut till inägans utkanter. Ett försök med spärrzon av konidiesuspension i mjäla-haltigt vatten gjordes emellertid, trots att möjligheterna att säkert avgöra åtgärdens effekt måste bedömas som små. Efter spridningen av suspensionen tillvaratogs ett stort material larver, vilka under loppet av 7 dagar drabbades av mykos till 56 %. Studiet av utvecklingen på försöksplatsen omöjliggjordes dock av en utomordentligt stark invasion av röda stackmyror, vilka samvetsgrant genom-

letade terrängen kring det avgränsade diket mellan betesvallen och skogen på jakt efter larver. Redan en kort undersökning av trafiken på myrstigarna visade, att myrornas larvfångst icke var av sporadisk art; sålunda räknades vid en enda väg 388 dödade och skadade gräsmaskar, som transporterades till stacken under 15 minuter. Ett prov av 170 sådana myrdödade larver undersöktes genom placering i fuktig kammare, varvid grönmykos utbildades på samtliga larver, ehuru flertalet exemplar troligen på grund av myrsyrans inverkan visade tydliga mykossymptom i form av hyfer och konidier endast kring munöppningen på huvudets undersida.

Fig. 20. Koremieliknande konidiesamlingar av *Metarrhizium anisopliae*.
Coremiform groups of conidia of *Metarrhizium anisopliae*

Enligt meddelande upprepades ej härjningen påföljande år, ett förhållande, som emellertid icke nödvändigt måste sättas i samband med de vidtagna åtgärderna. Trots att sålunda förutsättningarna för svampens användande mot gräsmasken kunna betraktas som gynnsamma, undandrar sig frågan om metodens praktiska tillämpbarhet ännu ett säkert bedömande.

Stora jordflyet, Rhyacia pronuba, och ärtflyet, Polia pisi.

Slutligen må två smärre försök mot larver av stora jordflyet, *Rhyacia pronuba,* och ärtflyet, *Polia pisi,* nämnas. Sedan infektionsförsök i fuktig kammare och i konidiebemängd jord av måttlig fuktighetstyp givit positiva resultat — hos större jordflyet konstaterades 82 % dödlighet, hos ärtflyet 95 % vid infektionsförsöken i jord — utnyttjades en lindrig härjning på trädgårdsland vid Sämstad i Bohuslän för frilandsförsök. Konidierna spredos genom torr överpudring av hela den angripna arealen, som utgjordes av 85 kvadratmeter morotkultur och 55 kvadratmeter sallatodling. Effekten av åtgärden blev efter analyserna att döma synnerligen god, i det att antalet döda eller paralyserade larver uppgick till genomsnittligt resp. 93 och 70 % av de före försökets igångsättande fastställda medeltalen för

larvfrekvensen. Ehuru inga kontrollparceller kunde anordnas — på grund av försöksmarkens ringa areal — torde dock försöket ha ådagalagt, att både det stora jordflyets och ärtflyets larver äro mottagliga för angrepp av *Metarrhizium* även under de betingelser, som råda i det fria. Anledningen till den markerade skillnaden i dödlighet hos frilandsexemplaren av de båda arterna, vilken icke överensstämde med de iakttagna förhållandena vid laboratoriestudier, torde främst vara ärtflylarvernas större benägenhet att uppehålla sig på vegetationen även under dagen, då praktiskt taget alla larver av det större jordflyet krypa ned i jordens ytlager och på detta sätt lättare måste infekteras av konidierna.

Vaxmottet, Galleria mellonella.

Som ett led i den tidigare nämnda allmänna prövningen av infektionsgraden hos ekonomiskt viktiga skadegörare har även en serie försök att utröna mottagligheten hos larver av vaxmott utförts. Till en början utfördes dessa studier i laboratoriet, men sedan det härvid visat sig att larverna snabbt infekteras och vid mättad luftfuktighet genomväxas av hyferna, ha studierna förts vidare till bekämpningsförsök under de förhållanden, som råda i praktiken. Den allvarligaste skadan åstadkomma vaxmottlarverna på vaxkakor, vilka biodlaren upplagt för förvaring antingen i tomma yngelrum eller i förvaringslådor, och det kan anses fastslaget att denna skada i första hand drabbar äldre kakor, som innehållit yngel och som genom förekomsten av flera lager hylsor erbjuda larverna goda näringsbetingelser. En annan, mindre vanlig men icke desto mindre stundom ödesdiger form av skadegörelse åstadkommes genom larvernas gnag i kakor, som ännu sitta kvar i yngelrummet hos försvagade samhällen. Det har med hänsyn till dessa förhållanden varit nödvändigt att undersöka larvernas mottaglighet dels i förvaringskammaren och dels i den bebodda bikupan. I båda fallen har hänsyn även måst tagas till den uppenbara risken, att konidierna kunna gro på biynglet, vilket betingat särskilda undersökningar över de olika utvecklingsstadiernas mottaglighet.

Vad först beträffar de teoretiska förutsättningarna för svampens tillväxt i vaxkakor, som lagrats i förrådsrum, så kan det framhållas, att luftfuktigheten i regel — i varje fall under vår och höst — är tillräckligt hög för groning. Under vintermånaderna sker dock ingen groning eller tillväxt på grund av den låga temperaturen. Upprepade försök med applicering av konidier på lagrade yngelkakor ha regelbundet visat, att konidierna gro på de kakor, som nyligen tagits ut ur bibostäderna, och som därför ännu hålla högre vattenhalt i hylsornas bottenlager än de långtidslagrade. Detta förhållande är av väsentlig betydelse, då det på grund härav icke kan väntas

att vaxmottlarver, vilka efter en tids förlopp angripa de preparerade yngelkakorna, angripas annat än i de delar av kakorna, där konidierna förhindrats gro på ett tidigare stadium. Om konidierna däremot appliceras först sedan kakorna genomtorkat sker ingen spontan groning och följden härav blir att larverna lättare infekteras, sedan de genom sitt gnag och avsättandet av exkrementanhopningar ökat betingelserna för groningen. Det är nämligen utomordentligt karakteristiskt, att larverna i en lagrad yngelkaka angripas först efter mycket lång inkubationstid.

Det närmare studiet av infektionsgraden hos vaxmottlarver har utförts dels i växtskyddsanstaltens bigård och dels i utbigård vid Hallinge.

Undersökningarna av mykosens utveckling i lagrade yngelkakor ha visat, att en överpudring med konidier först sedan kakorna förvarats någon månad medför en mycket stark stegring av dödligheten hos larverna. Det gynnsammaste resultatet har emellertid uppnåtts först efter närmare ett års inverkningstid i försökskammare med stark larvfrekvens, varvid dock endast två av de anställda 17 delförsöken ha resulterat i fullständig utrotning av larverna. 12 infektioner, av vilka hälften utfördes genom torr överpudring med rena konidier och hälften genom översprutning med 0,5 % konidiesuspension i såpvatten, ha givit en effekt av 55—76 %, medan tre försök med infektion av färska yngelkakor icke resulterat i tillfredsställande nedgång i larvfrekvensen. I de sistnämnda försöken kunde efter periodens utgång konstateras en riklig tillväxt av hyfer mellan cellhylsorna, men samtliga hyfer hade sedermera torkat in utan att utbilda egna konidier.

Studierna över vaxmottlarvernas mottaglighet för mykos i den bebodda bikupan ha gjorts huvudsakligen vid Hallinge, där ett samhälle uppställts i anslutning till en fröodling av rödklöver. Genom diverse ingrepp, betingade av nödvändigheten att utnyttja samhället för undersökningar över binas medverkan vid rödklöverns pollinering, försvagades samhället under eftersommaren så starkt, att vaxmottets larver fingo fotfäste på kakverket. Så snart detta konstaterats insattes i yngelrummet två äldre utbyggda kakor, vilka bepudrats med konidier, samtidigt som samhället trängdes ihop på sex ramar. Efter utfodring i vanlig ordning under hösten och våren undersöktes samhället efter rensningsflykten påföljande år och ånyo med 14 dagars mellantider under hela våren och försommaren. Samhället övervintrade väl utan onormalt stora förluster och satte rikligt med yngel efter drottningbyte under juni månad. Förekomsten av vaxmottlarver avtog för att den 9 juli helt upphöra. Samtidigt konstaterades att bina dragit ut mumier av vaxmottlarver ur kupan och släppt dem på marken framför flustret; dessa mumier visade typiska tecken på mykos. — En yngelkaka från det svampinfekterade samhället placerades därefter i försöksbur och infekterades med nya friska larver av vaxmott, vilka efter tre månader

samtliga angrepos av mykos och gingo under. En annan yngelkaka från samma samhälle och med kvarsittande yngel placerades hos ett icke konidieprepararat samhälle utan att någon menlig inverkan på biynglet kunde iakttagas.

Utfodringsförsök med konidiebemängt sockervatten ha likaledes givit klart negativa resultat: varken ynglet eller de fullbildade bina ha angripits av mykosen.

Av dessa orienterande studier synes sålunda framgå, att sporer av *Metarrhizium* kunna införas i bisamhällen utan att risk föreligger för att bina skola angripas. Svampens aggressivitet mot larver av vaxmott, som tidigare konstaterats bl. a. av Boscкowska (1935), medför, att larverna även under de förhållanden, som råda vid den praktiska driften av en bigård, kunna effektivt motverkas genom anbringande av konidier på såväl lagrade yngelkakor som angripna kakor i samhället.

Andra lepidoptera.

Här må endast som komplement till den ovan lämnade redogörelsen framhållas att en rad andra fjärillarver visat sig mottagliga för infektion. Sålunda ha larver av *Tinea pellionella, Tineola biselliella, Hoffmannophila pseudospretella, Tortrix paleana, Tortrix viridana, Blastodacna putripennella, Argyresthia conjugella, Lymantria dispar, Dasychira pudibunda* och *Sphinx pinastri* vid försök i fuktig odlingskammare angripits av mykos. Medan det beträffande vissa av de nämnda arterna (t. ex. päls- och klädesmalarna), icke kan utformas en praktiskt genomförbar bekämpningsmetod, torde frågan om metodens användbarhet mot andra arter böra ställas på framtiden, då måhända tillfälle erbjudes för prövning av olika spridningssätt.

Gallmyggor, Cecidomyidae.

I samband med en allmän undersökning av konidiegroningen på olika, i jord levande insekter har även frågan om gallmygglarvernas mottaglighet för angrepp av *Metarrhizium* upptagits för närmare studium. De inledande studierna ha utförts på övervintringsfärdiga larver av gula vetemyggan, *Contarinia tritici*.

Det är uppenbart att intresset för parasitsvampens eventuella betydelse för gallmygglarverna koncentreras på mottagligheten hos de stadier av larverna, som mera varaktigt uppehålla sig på eller i jorden. Under större delen av sitt näringsstadium leva ju praktiskt taget samtliga ekonomiskt viktiga arter inuti växtdelar, där de måste vara synnerligen svåråtkomliga för parasiten. De fullbildade gallmygghonorna avlägga regelmässigt sina

ägg direkt på den växt, som senare kommer att fungera som värdväxt för larverna. Dessa borra sig omedelbart efter kläckningen in i växtvävnaden, där de sedan uppehålla sig väl skyddade för infektion. Först efter näringsupptagandets avslutande inträder en kritisk period, då larverna söka sig ned till jordytan för uppsökande av lämplig övervintringsplats.

Av dessa skäl synes det vara av mindre vikt att undersöka de unga larvernas mottaglighet för angrepp, men det må nämnas, att en infektion av framprepparerade larver av exempelvis vetemygga regelbundet ger positiva resultat. Försöken ha emellertid i första hand utförts på material av utvandrande larver, vilka infekterats spontant vid beröring med underlaget. I det följande skall en redogörelse lämnas för de olika metoder, enligt vilka infektionens enskildheter närmare undersökts.

Insamlingen av försöksmaterial för laboratoriestudierna tillgick så, att angripna veteax med nästan fullbildade larver av gul vetemygga anskaffades. Axen hopbuntades och placerades i vågrätt läge i tyllburar, 4 decimeter från burens botten, där ett antal gipsskålar av ovan beskrivet slag men med 6 centimeter hög kant uppställdes. Gipsskålarna, som steriliserats, tillsattes till halva antalet med 7½ cc destillerat vatten; de övriga tillsattes med lika stor kvantitet konidiesuspension vardera. Vid en given tidpunkt, då enstaka larver konstaterades ha börjat vandra ut från axen, översprutades axen med vatten medelst en finfördelande fixerspruta i syfte att på detta sätt locka larverna till allmän utvandring. Larvernas reaktion mot den ökade fuktigheten medförde, att de rakt under axen stående skålarna tillfördes ett slumpvis fördelat larvmaterial. Sedan utvandringen minskat efter ett dygns exponering, försågos skålarna med vardera 50 cc steriliserad mjäla i ett jämnt lager över gipsytan, varefter locket påsattes.

Efter tio dagar undersöktes skålarnas innehåll. Mjälan placerades försiktigt i en cylinder, vars ena ände tillslutits med finmaskig mässingsduk; i denna silanordning sållades mjälan bort genom spolning i rinnande vatten och de kvarvarande larverna, som nu spunnit in sig i övervintringskokonger, kunde studeras under preparerlupp.

Härvid konstaterades, att samtliga larver hunnit påbörja förfärdigandet av kokongen; en varierande mängd hade emellertid icke förmått färdigställa hylsan utan lågo svagt krumböjda innanför en vall av spånad på plant underlag, troligen förfärdigad direkt på gipsplattan. Dessa larver utgjorde flertalet i de skålar, som fuktats med konidiesuspension.

En närmare undersökning av hyfernas inväxningssätt genom studium av snittat och azokarmin-mallory-färgat material gav vid handen, att larverna infekteras både genom huden och genom tarmen. Konidierna gro huvudsakligen vid segmentgränserna men kunna även utbilda hyfer på andra delar av segmentet. Genomväxningen av huden erbjuder inga märkbara svårigheter, men det är påfallande, att de flesta larver infekterats av

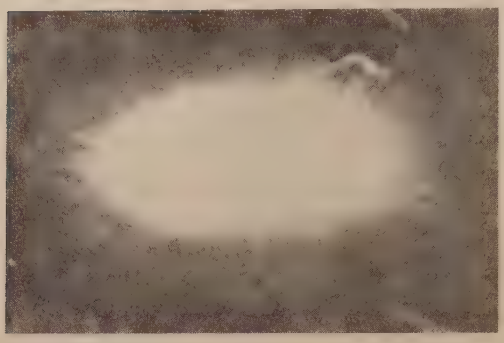


Fig. 21. Vetemygglarv angripen av grönmykos.
Wheat midge larva attacked by green muscardine.

hyfer, som grott ut på hudens översida och därefter vuxit in genom munhålan eller stigmata. Efter genombrottet växa hyferna synnerligen långsamt in i kroppsvävnaderna, och det är lätt att konstatera, att vetemygglarverna gå under på ett tidigare stadium av mykosen än andra undersökta insektarter. Redan innan hyferna hunnit genomtränga corpus adiposum, upphöra larvens livsyttringar, troligen på grund av förgiftning. Tillväxtbetingelserna för hyferna måste bedömas vara utomordentligt gynnsamma inne i övervintringskokongen, där otvivelaktigt mättad luftfuktighet råder och där risken för uttorkning är ringa.

Avräkningen av de första fyra jämförande försöken gav till resultat att 98 % av larverna i de konidiehaltiga gipsskålarna antingen dukat under i fullt utbildad grönmykos eller paralyserats och inom ytterligare 5 dagar förvandlats till mumier. I kontrollerna iakttogs ingen dödlighet.

Dessa gynnsamma orienterande undersökningar föranledde fortsatta studier under mera naturliga betingelser. Försöksanordningarna ändrades därför så till vida som tyllburarna placerades ute i det fria direkt på marken, som före befuktningen av axen översprutades med konidiesuspension. På hösten, strax före tjälningen, sållades jorden med användande av den ovan beskrivna metoden, varvid framgick att icke blott de larver, som utbildat bristfälliga kokonger, utan även larver i fullt normala övervintringskokonger drabbats av fatal mykos. Sammanlagt anträffades i 11 upprepningar endast 9 % (0—16 %) friska larver; de övriga visade höggradiga förändringar och voro samtliga genomvuxna av hyfer. Som särskilt karakteristiskt kan angivas, att mer än hälften av de larver, som förfärdigat kokonger och därefter angripits av mykosen, voro helt täckta av hyfer, medan en mindre del av larvmaterialet omvandlats till avlånga mumier, täckta av konidiemassor.

Direkta prövningar på fritt land under naturliga odlingsförhållanden ha utförts vid två tillfällen, båda gångerna vid Bräkne-Hoby i Blekinge. Här konstaterades sommaren 1938 ett lindrigt angrepp av den gula vetemyggan, varjämte larver av den röda vetemyggan, *Sitodiplosis mosellana*, förekommo tämligen rikligt. I syfte att undersöka om konidierna lika väl kunde spridas genom utpudring av pulverformig konidieblandning, användes vid det ena försöket en blandning av 99,7 % mjäla och 0,3 % konidier, som

spreds över en utstakad försöksparcell av 100 kvadratmeters storlek. Spridningen utfördes under regn vid tiden för *tritici*-larvernas utvandring, varefter avskurna angripna veteax placerades dels i två högar inom parcellen och dels i två högar nordost om denna parcell. På fältet utplacerades påföljande år 4 kläckningsburar av samma typ, som konstruerats av Mühlow (1936), 2 på försöksparcellen och 2 på fältet 80 meter nordost om parcellen (vid utspridningen hade ostlig vind rått, varför området närmast väster om parcellen icke med säkerhet kunde anses fritt från konidier). Fångstresultaten i lådorna gåvo ett överraskande gott utslag, i det att inga myggor kläcktes på försöksparcellen, medan sammanlagt 112 myggor erhöllos i de lådor, som placerats över de markerade kontrollplatserna.

Vid det andra försöket besprutades vetet direkt med en konidiesuspension i mjälhaltigt vatten innan larverna hunnit lämna axen, varefter angripna ax utlades i högar dels på det behandlade fältet och dels på ett skifte med samma gröda på 175 meters avstånd. Kontrollen skedde vid detta försök genom sållning av jorden under de båda högarna, varvid det visade sig att 91,5 % av larverna från det behandlade området dukat under, medan dödligheten hos larverna från den obehandlade marken, där provet likaledes togs från jorden under de nu bortförda axen, uppgick till 34 %.

Ett tredje försök med besprutning av vetet mycket tidigt på våren och med kontroll påföljande år har utförts på Ahlby säteri i Södermanland. Trots att detta försök gav till resultat en minskning av kläckningsfrekvensen med 95 % torde inga säkra slutsatser kunna dragas härav, då i detta fall inga undersökningar kunnat utföras över den normala dödligheten eller över riktigheten av antagandet, att orsaken till den konstaterade dödligheten hos försöksmaterialet verkligen kunde hänföras till mykos.

De gynnsamma resultaten av dessa försök med vetemygglarver ha givit anledning till liknande studier av angreppsgraden hos larver av *Contarinia pyrivora*. Larverna av denna svåra skadegörare på päronkart lämna i likhet med vetemygglarverna värdväxten vid fuktig väderlek och krypa ned i jorden, där de förfärdiga en övervintringskokong. De allmänna betingelserna för infektion synas sålunda vara överensstämmande för de båda gallmyggarterna.

Bekämpningsförsöken, som på grund av brist på ändamålsenliga försöksmarker endast utförts som orienterande studier i laboratoriet, ha koncentrerats på frågan om larvernas resistens mot infektion vid tiden för deras utvandring från de angripna karten. Försöksmetodiken har varit den enklast tänkbara med utläggning av angripna päronkart direkt på jord, som överpudrats med konidiehaltig mjäla. Samtliga anställda försök ha givit positiva resultat; dödligheten hos larverna, som kontrollerats genom stickprov under hösten och påföljande vår, har varierat i olika delförsök mellan 55 och 78 %. Vid dessa undersökningar har det konstate-

rats, att de larver, som icke infekterats före vinterperioden, regelbundet undgå mykosen.

Infektioner av larver av klövergallmyggan, *Contarinia leguminicola,* ha likaledes vid laboratorieförsök givit positiva resultat. I gipsskålar med mättad luftfuktighet sker konidiernas groning mycket snabbt, men hyfernas inväxning försiggår påfallande långsamt; en mängd larver dö, innan hyferna hunnit tränga in genom hypodermis. Infektionsförsök på fritt land i klöverfröodlingar, utförda vid Svalöf åren 1937 och 1938, ha bekräftat, att larverna äro mottagliga för mykosen. Dessa inledande försök ha utlagts enligt samma metod som försöken mot vetemygglarverna med kontroll av resultaten genom vattensållning av behandlad larvhaltig jord och räkning av antalet döda och paralyserade larver. Vid de två mera omfattande försöken, vilka utlagts på en areal av sammanlagt 240 kvadratmeter med fyra upprepningar om vardera 60 kvadratmeter, konstaterades, att mortaliteten hos larver på behandlad yta ökat till 82—85 %, medan den normala dödligheten i stickprov av obehandlat material icke översteg 45 %. Ett parallellförsök vid Flakaryd i Blekinge och tre mindre omfattande försök vid Järnavik och Stensnäs i samma landskap ha givit ännu gynnsammare resultat, men det har icke varit möjligt att på insänt material efterkontrollera den direkta dödsorsaken hos larverna, varför dessa försök torde böra lämnas utan avseende.

Fortsatta undersökningar över angreppsgraden av *Metarrhizium* på klövergallmygglarver ha måst anstå i väntan på ett förnyat massuppträdande av klövergallmyggan, som efter 1940 icke rapporterats från de tidigare kända härjningslokalerna.

Övriga insekter.

Slutligen må lämnas en redogörelse för infektionsförsök med olika skadedjur, vilka antingen visat sig vara helt immuna mot angrepp av mykos eller endast angripits i ringa grad och sålunda visat stark resistens mot *Metarrhizium*. Samtidigt upptages i förteckningen sådana skadeinsekter, som visserligen angripas, men på grund av sitt levnadssätt icke kunna nås av infektion; beträffande denna sistnämnda grupp ha försöksresultaten endast teoretiskt värde.

Hoppstjärtar, Collembola. Flera försök vid Svalöf att medelst utpudring av konidiematerial över isolerade klöverplantor, angripna av sminthurider, nedbringa antalet skadedjur ha givit negativa resultat. I intet fall har symptom på mykos iakttagits hos dessa vanliga skadegörare.

Rätvingar, Orthoptera. Infektionsförsök med larver och fullbildade exemplar av *Stauroderus bicolor,* vilka i Dannemora hade angripit tvååriga granplantor, ha givit positiva resultat. Metoden torde emellertid icke kunna

tillämpas i praktiken på grund av svårigheten att anbringa konidierna på sådant sätt, att de icke gå under i förtid, innan de hunnit infektera gräshopporna.

Tripsar, Thysanoptera. Undersökningar över ärttripsens och korstripsens reaktion mot konidierna ha visat, att skadedjuren icke ens vid mättad luftfuktighet angripas av mykos. Samma negativa resultat ha erhållits vid försök att infektera nejliktrips på *Asparagus*-kulturer i växthus.

Skinnbaggar, Hemiptera. Trots att en mängd arter av skinnbaggar infekterats i fuktig kammare, har effekt konstaterats mot endast en art, nämligen *Dolycorus baccarum*. Upprepade efterkontroller i det fria ha emellertid även beträffande denna art givit negativa resultat.

I övrigt ha följande arter infekterats utan effekt:

Graphosoma italicum
Eurydema oleraceum
Elasmucha grisea
Miris dolabratus
Lygus pabulinus och *pratensis*
Adelphocoris lineolatus
Philaenus spumarius
Calligypona (Delphax) pellucida
Trialeurodes vaporariorum
Doralis pomi
Acyrtosiphon onobrychidis (= Macrosiphum pisi)
Dreyfusia nüsslini.

Skalbaggar, Coleoptera. Förutom de tidigare nämnda arterna, vilka tilldraga sig speciellt intresse på grund av sin mottaglighet för mykos, ha flera skadegörare bland vivlarna, knäpparna, bladhorningarna och långhorningarna varit föremål för studier.

Beträffande *Apion*-arterna hänvisas till redogörelse för infektionsförsök (meddelande nr 22, 1938). Infektioner av larver och fullbildade exemplar av *Strophosomus rufipes, Phytonomus variabilis* och *nigrirostris, Ceutorrhynchus quadridens* och *rapae* ha givit ringa effekt med lägst 9 och högst 42 % dödlighet hos larverna och lägst 12 och högst 20 % dödlighet hos imagines. Det måste emellertid framhållas, att försöken ännu icke kunnat utläggas under fullt kontrollerbara förhållanden, varför fortsatta undersökningar få närmare utreda angreppsgraden.

Infektioner av *Otiorrhynchus singularis, Phyllobius pyri* och *Sitona lineatus* ha icke givit entydiga resultat.

Upprepade försök att infektera larver och imagines av *Calandra granaria* och *oryzae* ha misslyckats. De fullbildade skalbaggarna äro till den

grad motståndskraftiga mot de groende konidierna, att de tåla flera dygns vistelse i odlingskärl, där kokt havre infekterats med konidier för massproduktion i spridningsmaterial. I intet fall har dödlighet iakttagits, som kunnat hänföras till mykos.

Samma påtagliga resistens mot angrepp av grönmykos visa larver av *Agriotes lineatus* och *Corymbites aeneus*. Icke heller imagines av dessa viktiga skadegörare, som genom sitt liv nere i fuktig jord teoretiskt kunna vara begärliga objekt för parasitsvampens verksamhet, ha visat tecken till mottaglighet för mykos.

Omfattande infektionsförsök med material av bladhorningar ha utförts i samband med bekämpningsförsök i fria marker mot kastanjeborre, trädgårdsborre och bruna ollonborren. Trots att dessa försök tyvärr icke givit entydiga resultat, torde de emellertid böra upptagas till närmare diskussion, då en tydlig effekt konstaterats i enstaka fall. Enligt meddelande från utländska försöksstationer, där frågan om insekternas svampsjukdomar varit föremål för intensiv uppmärksamhet, alltsedan Metschnikoff påvisade mykosernas stora betydelse för insektfrekvensen, angripes larven av den vanliga ollonborren häftigt av *Metarrhizium anisopliae*. Sålunda meddelar Siemaszko (1937), att larverna angripas i stor utsträckning av parasitsvampar och att *Metarrhizium* iakttagits för första gången i Polen på ollonborrar och *Anomala aenea*. Vidare rapporterar Pospeloff (1935) en utbredd mykos bland dessas larver i fria fältet, orsakad av *Metarrhizium*.

Inom ramen för föreliggande undersökning ha tre bekämpningsförsök mot kastanjeborrens larver utförts, två i Halland och ett på Öland. De halländska försöken gåvo inga säkra resultat — visserligen kunde en minskning av larvfrekvensen med 45 % konstateras vid undersökning efter två månader, men då larvantalet även på kontrollmark gått ned med 37 % torde försiktigheten bjuda, att resultaten bokföras som synnerligen osäkra. Försöket på Öland utfördes på en angripen gräsvall vid Högby och resulterade i en larvminskning av 88 % (i kontrollparcell hade larvantalet ökat med 3 %), varför metoden, i all synnerhet som samtliga undersökta larver visade sig angripna av mykos, torde vara förtjänt av vidare prövning mot kastanjeborre.

Infektionsförsök mot larver av trädgårdsborre ha utlagts vid Dannemora och på Adelsö i Mälaren. I det förra fallet hade en stark invasion ödelagt en del av en plantskola för skogsträd, varvid de treåriga granplantorna torkat efter rotgnag. Spridningen av konidiematerialet utfördes redan innan tjälen gått ur jorden, och medan ännu snön täckte markytan. Resultaten registrerades efter undersökning av insända jordprov och med hjälp av plantskoleskötaren på platsen; utstrykningspreparat visade, att den lätta sandjorden höll rikligt med konidier ännu 6 månader efter spridandet. Trots tidsödande sållning av de behandlade parcellerna kunde perso-

nalen vid plantskolan 8 veckor efter konidiernas utspridning icke anträffa en enda levande larv, men det måste samtidigt framhållas, att larverna voro försvunna även från de utlagda kontrollytorna. Dessa kontroller voro visserligen på grund av utrymmesbrist synnerligen smala — endast 65 cm — och det kan därför tänkas, att konidierna vid snösmältningen och tjällossningen spritt sig ut över hela ytan, men säkra hållpunkter för detta antagande saknas.

Försöket på Adelsö utlades i en i det närmaste förstörd gräsmatta, men vid analys påföljande år konstaterades ånyo en utomordentligt stark invasion av larver. I detta fall bedömdes resultatet som fullkomligt negativt, varför andra åtgärder tillgrepos för bekämpningen.

Vid ett försök att bekämpa en utbruten massförekomst av larver av den bruna ollonborren vid Ahlby säteri i Södermanland konstaterades ingen tydlig effekt; mot varje förmodan begränsades härjningen dock till ett litet avsnitt av den angripna ängsmarken, där markfuktigheten var lägst. I omedelbar närhet av den ursprungliga invasionsplatsen var marken starkt sur och de larver, som redan före konidiernas utspridning sökt sig dit, dogo snart i tydliga symptom på mykos, sedan konidierna spritts ut över den fuktiga marken.

Ett försök att infektera larver av *Oryctes nasicornis* misslyckades, trots att infektionsförsöket utlades i starkt fuktig gödselhaltig sågspån, där mykosen kunde tänkas ha goda utvecklingsmöjligheter. Detta resultat är så mycket mer anmärkningsvärt som det efter Friedrichs (1919) och Park's (1935) undersökningar är känt, att *Oryctes rhinoceros* kan bekämpas med användande av *Metarrhizium anisopliae*.

Flera försök att bekämpa *Saperda carcharias* och *Pogonochaerus fasciculatus* genom att i deras gnaggångar injicera konidiesuspension i såplösning ha givit negativa resultat.

Flugor, Diptera. Erfarenheterna vid infektionsförsök med larver av *Fannia canicularis, Musca domestica* och *Eristalis tenax* visa, att dessa insekter äro totalt immuna mot mykosen.

Steklar, Hymenoptera. Infektionsförsök med material av granspinnarsteklar ha givit positiva resultat, i det att 67—80 % av larverna i jorden angripits och destruerats av parasitsvampen. På grund av synnerligen bristfälliga försöksanordningar kunna emellertid dessa resultat icke betraktas som vägledande; fortsatta studier krävas för frågans ytterligare belysande, innan metoden är mogen för praktiska prov.

ENGLISH SUMMARY.

1. The germination of the conidia of *Metarrhizium anisopliæ* (Metsch.) Sorok. is evidently conditioned in insects by action from the fat layer of the chitin. This is indicated by the results of staining experiments with sudan III, treatment of the conidia with osmium, experimental investigations into the reaction of the conidia on chitin treated with fat solvents, studies of the wettability of the conidia after treatment with emulgents, and investigations into the condensation of water round conidia treated with fat solvents.

2. The penetration of the hyphae through the chitin takes place with the help of chitinase. The rate of penetration is influenced by the structure of the chitin, the age of the chitin, and the activity of the leucocytes under the mother cells of the chitin.

3. In their way of growth inside the host animal the hyphae show a remarkable affinity for adipose tissue.

4. The mortality of the host animals is conditioned by the toxic effect of the hyphae.

5. Positive results in combating experiments have been obtained in the case of the following insect pests:

Sphinx pinastri	*Tortrix paleana*
Dasychira pudibunda	*Tortrix viridana*
Lymantria dispar	*Cossus cossus*
Agrotis segetum	*Tinea secalella*
Agrotis nigricans	*Blastodacna putripennella*
Agrotis tritici	*Hoffmannophila pseudospretella*
Rhyacia pronuba	*Argyresthia conjugella*
Barathra brassicae	*Contarinia tritici*
Polia oleracea	*Contarinia pyrivora*
Polia pisi	*Contarinia leguminicola*
Cerapteryx graminis	*Melolontha hippocastani*
Galleria mellonella	*Serica brunnea*
Ephestia kühniella	

The combating experiments in stocks of grain in the case of grain-moth larvae, *Tinea secalella*, have not given unambiguous results, for which reason continued investigations will be needed.

6. The following species have proved susceptible to attacks of green muscardine, but the degree of infection has not reached satisfactory values:

Stauroderus bicolor
Dolycoris baccarum
Strophosomus rufipes
Phytonomus variabilis
Phytonomus nigrirostris
Ceutorrhynchus quadridens
Ceutorrhynchus rapae
Otiorrhynchus singularis
Phyllobius pyri
Sitona lineatus
Phyllopertha horticola (possibly highly susceptible).

7. The following insect pests have proved immune to green muscardine:

Sminthuridae
Thysanoptera
Graphosoma italicum
Eurydema oleraceum
Elasmucha grisea
Miris dolabratus
Lygus pabulinus
Lygus pratensis
Adelphocoris lineolatus
Philaenus spumarius
Calligypona (Delphax) pellucida
Trialeurodes vaporariorum
Doralis pomi
Acyrtosiphon onobrychidis (= *Macrosiphum pisi*)
Dreyfusia nüsslini
Calandra granaria
Calandra oryzae
Agriotes lineatus
Corymbites aeneus
Oryctes nasicornis
Saperda carcharias
Pogonochaerus fasciculatus
Fannia canicularis
Musca domestica
Eristalis tenax.

8. The possibilities of using the muscardine as a biological combating means against susceptible insect pests may be considered good for the following reasons: there is no difficulty in preparing conidial material artificially on a large scale; spreading may take place both in a water suspension with the addition of 0.5 % soft soap and in a mixture with dry, inert filling substances such as fine silt, sand, Kieselguhr and talc; the resistance of the conidia to intense cold and violent changes of temperature is satisfactory; the fungus is a pronounced optional parasite able to fructify also as a saprophyte.

LITTERATUR.

Ahlberg, O. Ett massuppträdande av jordflylarver. — Växtskyddsnotiser 1943.

—„— Jordflyhärjningar i Västervikstrakten. — Växtskyddsnotiser 1943.

Andersen, K. Th. Der Einfluss der Umweltbedingungen (Temperatur und Ernährung) auf die Eierzeugung und Lebensdauer eines Insekts (Sitona lineata L.) mit postmetaboler Eientwicklung und langer Legezeit. — Z. angew. Ent. 20, Berlin 1934.

Bertus, L. S. Report on the Work of the Mycological Division. — Ann. Rep. Div. Agric. Ceylon 1935, 1936.

Bodenheimer, F. S. Über die Voraussage der Generationenzahl von Insekten. III. Die Bedeutung des Klimas für die Landwirtschaftliche Entomologie. — Z. angew. Ent. 12, Berlin 1927.

—„— Über die Grundlagen einer allgemeinen Epidemiologie der Insektenkalamitäten. — Z. angew. Ent. 16, Berlin 1930.

Boscкowska, M. Contribution à l'étude de l'immunité chez chenilles de Galleria mellonella L. contre les champignons entomophytes. — C. R. Soc. Biol., Paris 1935.

Bovien, P. og Jørgensen, M. Fortsatte Undersøgelser over Angreb af Snudebiller (Apion) i Kløverhoveden. — Tidsskrift for Planteavl 41, Köpenhamn 1936.

Bremer, H. Grundsätzliches über den Massenwechsel von Insekten. — Z. angew. Ent. 24, Berlin 1929.

Cook, W. C. The distribution of alfa weevil. — J. agr. res. 30, Washington 1925.

Delacroix, G. Oospora destructor, champignon produisant sur les insectes la muscardine verte. — Bull. Soc. Myc. 9, Paris 1893.

Friedrichs, K. Studien über Nashornkäfer als Schädlinge der Kokospalme. — Monographien zur angew. Entomologie 4, Berlin 1919.

Glaser, R. W. The economic status of the fungous diseases of insects. — Journ. Econ. Ent. 7, Concord, N. H. 1914.

—„— Note on the cultivation of Metarrhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin, from vegetative form in Silkworms. — Ann. of the Ent. Soc. of America, Columbus, Ohio 1928.

Hergula, B. On the application of Metarrhizium anisopliae against Pyrausta nubilalis. — Intern. Corn Borer Invest. 3, Chicago 1930.

Hesselmann, H. Klimatets humiditet i vårt land och dess inverkan på markvegetation och skog. — Medd. fr. Statens Skogsförsöksanstalt 26, Stockholm 1913.

Johansson, E. Studier och försök rörande vetemyggorna. VI. Undersökning av vetemyggornas parasiter. 2. Vetemyggparasiternas ekologi. — Statens växtskyddsanstalt Medd. 21, Stockholm 1937.

Johnpulle, A. L. Temperatures lethal to the green muscardine fungus, Metarrhizium anisopliae (Metsch.) Sor. — Trop. Agriculturist XC, Colombo 1938.

KATSURA, S. K. Inoculation of young Cicada nymphs with spores of green muscardine disease. — J. econ. Ent. 31, Menasha, Wisc. 1938.

LAKON, G. Die mykologische Forschung der Pilzkrankheiten der Insekten und die angewandte Entomologie. — Z. angew. Ent. 1, Berlin 1914.

—„— Die Insektenfeinde aus der Familie der Entomophthoreen. Beiträge zu einer Monographie der insektentötenden Pilze. — Z. angew. Ent. 5, Berlin 1919.

—„— Entomophthoraceen — Studien I—IV. — Z. angew. Ent. 21, Berlin 1934.

LEWIN, C. J. Agriculture in the Territory. — Rep. of Dep. Agric. N. Rhod. 1935, 1936.

LINDEMANN, I. V. On the question of the Control of the Beet weevil by means of muscardine. — La Defense des Plantes, Leningrad 1926.

NATTRASS, R. M. Preliminary notes on some entomogenous fungi in Egypt. — Min. of Agric. Egypt. Tech. & Sci. Service (Bot. Sect.) Bull. 120, 1932.

NOTINI, G. Klövergallmyggan, ett skadedjur på rödklöverfröodlingar. — Växtskyddsnotiser 1938.

—„— Undersökningar rörande på rödklöver levande spetsvivlar, Apion Herbst. 2. Ekologiska undersökningar. — Statens Växtskyddsanstalt Medd. 22, 1938.

—„— Nya försök med biologisk bekämpning av skadeinsekter. — Växtskyddsnotiser 1940.

—„— Grönmykosen som bekämpningsmedel. — Växtskyddsnotiser 1942.

PARK, M. Report on the Work of the Mycological Division. — Ann. Rep. Div. Agric. Ceylon 1934, 1935.

PETSCH, T. Notes on entomogenous fungi. — Trans. Brit. mycol. Soc. XIX, Cambridge 1935.

POSPELOFF, V. P. Results of the Work accomplished by the Lab. for Insect Diseases in the Development of a system for the microbiological Control of harmful insects. — Summ. Sci. Res. Wk. Inst. Plant Prot., Leningrad 1936.

RORER, J. B. The green muscardine of froghoppers. — Proc. Agr. Soc. Trinidad and Tobago 10, 1910 (Ref. Exp. Sta. Rec. 24, 1911).

SIEMASZKO, W. Studies on entomogenous fungi of Poland. — Arch. Nauk. Biol. 1937. (Ref. Rev. Appl. Myc. 1937.)

SWINGLE, H. S. Life history of the Pecan weevil. — 42nd & 44th Ann. Rep. Alabama Agric. Exp. Sta. 1931 o. 1933.

TAMM, O. Studier över jordmånstyper och deras förhållande till markens hydrologi i nordsvenska skogsterränger. — Medd. fr. Statens skogsförsöksanstalt 26, Stockholm 1931.

THOM, Ch. The Penicillia, London 1930.

WALLENGREN, H. Metarrhizium anisopliae och Pyrausta nubilalis. HB. — Kungl. Fysiografiska Sällskapets Handlingar. Bd 40 Nr 15, Lund 1929.

—„— Metarrhizium anisopliae och Pyrausta nubilalis Hb. — Lunds Univ. Årsskrift 1929.

—„— Metarrhizium såsom medel i kampen mot Pyrausta nubilalis Hb. — Lunds Univ. Årsskrift N. F. 1931.

VUILLEMAIN, P. Les Isaria du genre Penicillium. — Bull. Soc. Myc. 20, Paris 1904.

WIZE, K. F. Contributions à la flore des entomophytes de l'Ukraine. — Proc. Internat. Congress, Plant. Sc., Ithaca 1926, 1929.

VOUK, V. und KLAS, Z. Über einige Kulturbedingungen des insektentötenden Pilzes Metarrhizium anisopliæ (Metsch.) Sor. — Acta Bot. Inst. Bot. Univ. Zagrebensis VII. 1932.

II. Fysiologiska undersökningar över grönmykosens svamp.

Av D. LIHNELL.

Innehåll.

Sid.

Inledning 60
I. Försöksobjekt och allmän metodik 60
II. Svampens beroende av substratets H-jonskoncentration 62
III. Temperaturens inverkan på tillväxten 68
IV. Tillväxten i närlösningar med olika kol- och kvävekällor 70
A. Försök med olika kolkällor 70
B. Försök med olika kvävekällor 76
V. Svampens beroende av tillväxtfaktorer 77
VI. Diskussion av försöksresultaten 81
English summary 84
Litteratur 90

Inledning.

Möjligheten att använda *Metarrhizium anisopliae* för en biologisk bekämpning av skadeinsekter har gjort, att svampen flitigt behandlats i litteraturen. De offentliggjorda undersökningarna ha emellertid så gott som utan undantag varit övervägande inställda på de frågor, som rört själva insektsbekämpningen och dess utförande, och den fysiologiska sidan av saken har blivit ganska styvmoderligt behandlad. Frånsett enstaka uppgifter hos olika författare rörande lämpliga substrat o. s. v., finner man endast hos Vouk & Klas (1932) ett försök att mera systematiskt studera svampens krav på miljön. De av Vouk & Klas vunna resultaten komma att närmare behandlas i det följande. En av författarna utlovad mera brett lagd studie över svampens fysiologi har mig veterligen ännu icke publicerats.

Mina här framlagda undersökningar gälla svampens beroende av några viktigare miljöfaktorer vid odling under laboratorieförhållanden. Undersökningarna äro i huvudsak upplagda efter samma, av ämnets natur givna linjer, som följts av Vouk & Klas, men ha fått en vidare omfattning och utförts under tillämpning av en annan metodik.[1]

I. Försöksobjekt och allmän metodik.

Föremål för undersökningarna har varit en av G. Notini isolerad stam av *M. anisopliae*. Med konidier från en agarkultur av denna stam gjorde jag på vanligt sätt en spridning, och bland de enspormycel, som därvid isolerades och som habituellt sett voro inbördes fullkomligt överensstämmande, valdes ett som utgångspunkt för en uppförökning av ympmaterialet till de i det följande beskrivna försöksserierna. Alla i dessa ingående kulturer ha alltså ett med säkerhet konstaterat ensartat ursprung.

Stamkulturerna av svampen ha omväxlande odlats på flera olika substrat för att den »degeneration», som så ofta träffar svampmycel under konstlade odlingsbetingelser, i möjligaste mån skulle motarbetas. Sålunda ha använts agarsubstrat med enbart maltextrakt eller med närsalter och socker samt mindre mängder malt- eller jästextrakt, potatis-glykosagar, pepton-glykosagar, maltgelatin, autoklavsteriliserad havre eller risgryn o. s. v.

[1] Undersökningarna äro utförda hösten 1940 –våren 1941. Manuskriptet förelåg tryckfärdigt hösten 1941, och frånsett en del formella ändringar återges det här i det skick det då befann sig. Hänsyn har alltså icke tagits till den hithörande litteratur, som eventuellt sedan 1941 utkommit.

Ympmaterialet för själva försöken ha dock genomgående tagits från kulturer på maltextraktagar (2,5 % maltextrakt »Vitrum», 1,5 % agar).

I samtliga försöksserier utom dem, som gällt sambandet mellan tillväxt och temperatur, har svampen odlats på närlösningar i Jenaglaskolvar (100 cm^3 Erlenmeyer-; som regel 20 cm^3 närlösning per kolv). Kolvarna liksom alla övriga ifrågakommande glasvaror ha före varje försök rengjorts genom behandling med bikromatsvavelsyra och följande noggrann sköljning med vanligt destillerat vatten. Av kemikalier ha så långt möjligt använts »pro analysi»-kvalitéer och eljest renast möjliga handelsvara. Steriliseringen av substraten har skett medelst kortvarig autoklavering vid 120° C (Jfr. Melin, s. 1063; även Davis & Rogers s. 108) eller, undantagsvis, medelst filtrering genom Berkefeldfilter.

Lösningarnas pH bestämdes före och efter försöken på elektrometrisk väg enligt kinhydronmetoden. pH-värden över 7,5 kontrollerades med Lyphan-papper.

I de första försöken ympades varje kolv med ett litet stycke (ca. 2 mm diam.) av en ung agarkultur, där konidiebildning ännu icke kunnat iakttagas (kontroll i mikroskop). Det visade sig emellertid att i flertalet försökskolvar uppstod flera än den avsedda enda svampkolonien; förmodligen ledde »yngelkolonierna» sitt ursprung från lösryckta hyffragment eller från enstaka konidier, som trots allt redan hunnit bildas på ympbitarna. De extra tillkomna svampkolonierna betydde en kraftig ökning av mycelproduktionen och förryckte därigenom starkt försökssiffrorna. Smärre variationer av denna metod med ympning med mycel ledde visserligen till något bättre men dock ej fullt tillfredsställande resultat. I fortsättningen tillfördes därför svampen i form av en konidiesuspension i sterilt, destillerat vatten, vanligen 1 cm^3 per kolv. Genom att dels göra konidiesuspensionen mycket tät, dels vid ympningen utgå från en i förhållande till åtgången stor volym suspension, i vilken genom ofta upprepad omskakning konidierna höllos så jämnt fördelade som möjligt, och i övrigt genom iakttagande av största möjliga likformighet vid upprepningen av de olika arbetsmomenten sökte jag skaffa garantier för att utgångspunkten för tillväxten blev praktiskt taget densamma i alla kulturer inom en och samma försöksserie.

Då tillräckligt stora utrymmen med termoreglering ej stodo till förfogande har temperaturen under försökens gång som regel ej kunnat hållas så konstant som önskvärt varit. För flertalet försöksserier ligger dock temperaturfaktorn mellan 20° och 25° C.

Tillväxten i vätskekulturerna mättes genom vägning av de torkade mycelen. Vid försökens slut upphettades kulturerna 10 min. vid 100° C i autoklav för att döda mycel och konidier (pH bestämdes före upphettningen). Mycelen avskiljdes i en sil av fint mässingsnät och sköljdes upprepade gånger med destillerat vatten. Sedan överskottet av vätska så långt möjligt

avlägsnats genom att silen med mycelet under lätt press med en spatel trycktes mot filtrerpapper, fingo mycelklumparna förtorka 1—2 dygn på en bricka av mässingsnät (under upprepad omflyttning för att de ofta mycket starkt slemmiga mycelen ej skulle fastna på nätet). Till sist torkades till viktskonstans (ca. 4 tim.) i ugn vid 95° C.

II. Svampens beroende av substratets H-jonskoncentration.

För undersökningen av sambandet mellan myceltillväxten och substratets H-jonskoncentration använde jag en serie buffrande närlösningar med α-alanin som N-källa enligt de av Lindeberg givna föreskrifterna. I stället för aneurin tillsattes emellertid 0,02 % jästextrakt (se nedan s. 78). Vidare utgick jag av bekvämlighetsskäl från icke-sterila standardlösningar och kunde alltså blanda till buffertlösningarna utan att behöva laborera med sterila pipetter o. s. v. Buffertlösningarna autoklaverades och hälldes efter avsvalning över i större kolvar innehållande motsvarande mängd likaledes autoklaverad »grundlösning». De därmed färdigberedda närlösningarna pipetterades sedan på vanligt sätt aseptiskt över i kulturkolvarna.

I de första försöksserierna ympades kulturerna med agarbitar innehållande mycel. På grund av de i det föregående omnämnda olägenheterna med detta förfarande övergick jag för de senare försöken till ympning med konidiesuspension.

Vid en rent okulär uppskattning av försökskulturerna, föreföll sambandet mellan myceltillväxten och närlösningarnas H-jonskoncentration vara tämligen klart. (Fig. 1). Vid pH 2 grodde visserligen konidierna men tillväxten var sedan ytterst obetydlig och gav endast upphov till otaliga, fritt liggande mikrokolonier, som med det ovan beskrivna förfaringssättet ej läto sig uppsamlas och vägas. Vid pH 3 började emellertid en till utseendet normal myceltillväxt, vars hastighet långsamt tilltog med stigande pH-värden och nådde ett m. el. m. tydligt markerat maximum vid pH 7. Med tilltagande alkalitet sjönk därefter tillväxthastigheten sakta. Svårigheten att vid pH-värden över 8—9 framställa närlösningar med erforderliga buffertegenskaper gjorde att den övre gränsen för mycelets tillväxt ej nåddes vid dessa försök.

Vägningen av mycelen avslöjade emellertid, att inom försöksleden förelåg en oavsett ympningssättet ganska stark individuell variation mellan mycelvikterna. De varierande värdena på mycelproduktionen inom ett och samma försöksled — även när ympningarna skett med konidiesuspensioner och under iakttagande av största möjliga likformighet i alla arbetsmoment — torde framför allt få tillskrivas den slumpvisa fördelningen mellan ytmycel och submersa mycel och den olika tillväxthastigheten hos dessa båda mycelkategorier. De på vätskeytan flytande mycelen växa betydligt fortare än de i vätskan helt nedsänkta och en från början obetydlig

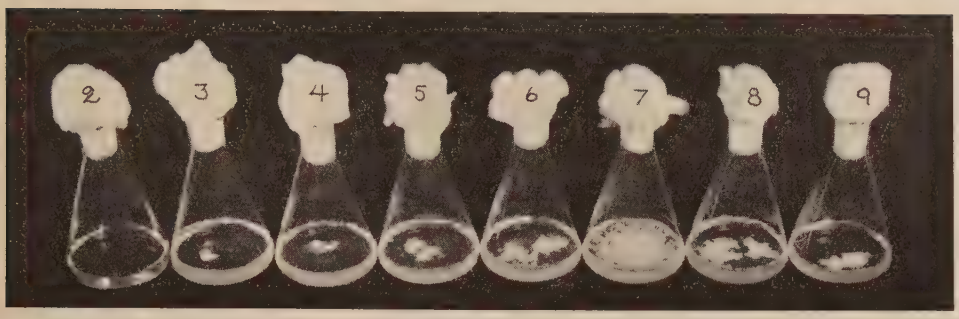


Fig. 1. *Metarrhizium anisopliae* odlad i närlösningar med olika vätejonskoncentrationer. 6 dagar gamla kulturer. Siffrorna på bomullspropparna ange de ungefärliga pH-värdena vid försökets början.

M. a. cultivated in nutrient solutions of different hydrogen-ion concentrations. The cultures 6 days old. The figures on the cotton plugs give the approximate values of pH at the beginning of the experiment.

skillnad i mycelmängd blir därför under försökets förlopp avsevärt förstorad. Verkan härav på skördemedeltalens medelfel skulle givetvis kunna minskas genom en motsvarande ökning av antalet kulturer inom varje försöksled, en ökning, som dock skulle behöva vara ganska avsevärd och därför av utrymmes- och andra skäl ej lät sig genomföras i praktiken. Då emellertid saken tycktes mig ha ett mera allmänt metodologiskt intresse, sökte jag gå fram efter andra linjer och genomförde ett flertal försöksserier i förhoppning om att genom smärre förändringar av metodik och försöksbetingelser få fram ett statistiskt säkrare siffermaterial. Det åsyftade resultatet uteblev emellertid, och då försöken f. ö. ej medförde något väsentligt nytt till karakteristiken av försöksobjektet, avstår jag här från en närmare redogörelse och nöjer mig med att lägga fram siffermaterialet från tre försöksserier (tab. 1). Siffermaterialets brister kompenseras i viss mån genom att försöksserierna givit i huvudsak överensstämmande resultat. Riktigheten av de okulära iakttagelserna bekräftas, även om skillnaderna mellan de olika försöksleden vid vägningen befunnos mindre framträdande än man kunnat vänta sig. De av skördemedeltalen bildade tillväxtkurvorna (fig. 2) ha genomgående en ganska flack form och uppvisa omkring pH 7 ett maximum, som dock är föga markerat.

Icke endast kvantitativt utan även kvalitativt ådagalades svampens beroende av H-jonskoncentrationen. Från pH 3 och uppåt bestodo kolonierna dels av ett submerst bottenmycel, m. el. m. starkt häftande vid glasväggen och av en mäktighet, som tilltog med stigande pH-värden, dels ett på ytan flytande mycel, som vid pH 3—5 var tämligen homogent och sammanhängande men vid pH 6 och däröver fick en m. el. m. utpräglat grynig eller flockig struktur. Starkast framträdde grynigheten omkring pH 7.

Tab. 1. *Myceltillväxten i närlösningar med olika H-jonskoncentrationer.*
Mycelial growth in nutrient solutions of different H-ion concentrations.

Försök 1 Experiment 1				Försök 2 Experiment 2				Försök 3 Experiment 3			
pH			Mycel, torrvikt i mg Dry-weight of mycelium in mg	pH			Mycel, torrvikt i mg Dry-weight of mycelium in mg	pH			Mycel, torrvikt i mg Dry-weight of mycelium in mg
Början Original	Slut Final	Diff.		Början Original	Slut Final	Diff.		Början Original	Slut Final	Diff.	
2,0	2,0	± 0	[1])	2,0	2,0	± 0	[1])	2,0	2,0	± 0	[1])
2,5	2,5	± 0	3,5 ± 0,7	3,0	2,9	− 0,1	13,5 ± 0,9	2,9	2,9	± 0	9,0 ± 0,3
3,9	3,9	± 0	10.7 ± 1,8	4,0	3,9	− 0,1	19,0 ± 1,0	3,8	3,8	± 0	11,2 ± 0,2
5,0	4,7	− 0,3	13,5 ± 1,4	5,1	4,8	− 0,3	22,0 ± 0,3	4,8	4,5	− 0,3	11,3 ± 0,4
5,9	5,8	− 0,1	13,9 ± 1,2	6,0	5,8	− 0,2	25,9 ± 1,2	5,9	5,6	− 0,3	11,2 ± 0,6
6,9	6,8	− 0,1	15,9 ±2,3	6,9	6,5	− 0,4	26,8 ± 0,7	6,9	6,5	− 0,4	15,5 ± 1,2
7,7	7,4	− 0,3	9,8 ± 1,8	7,8	6,8	− 1,0	24,2 ± 2,5	7,8	7,1	− 0,7	12,3 ± 0,6
9,0	7,8	− 1,2	7,8 ± 1,1	9,0	8,5	− 0,5	20,0 ± 0,2	8,6	7,5	− 1,1	7,0 ± 0,2

[1]) Otaliga mikrokolonier, ej vägbara. (Innumerable small colonies, not weighable.)

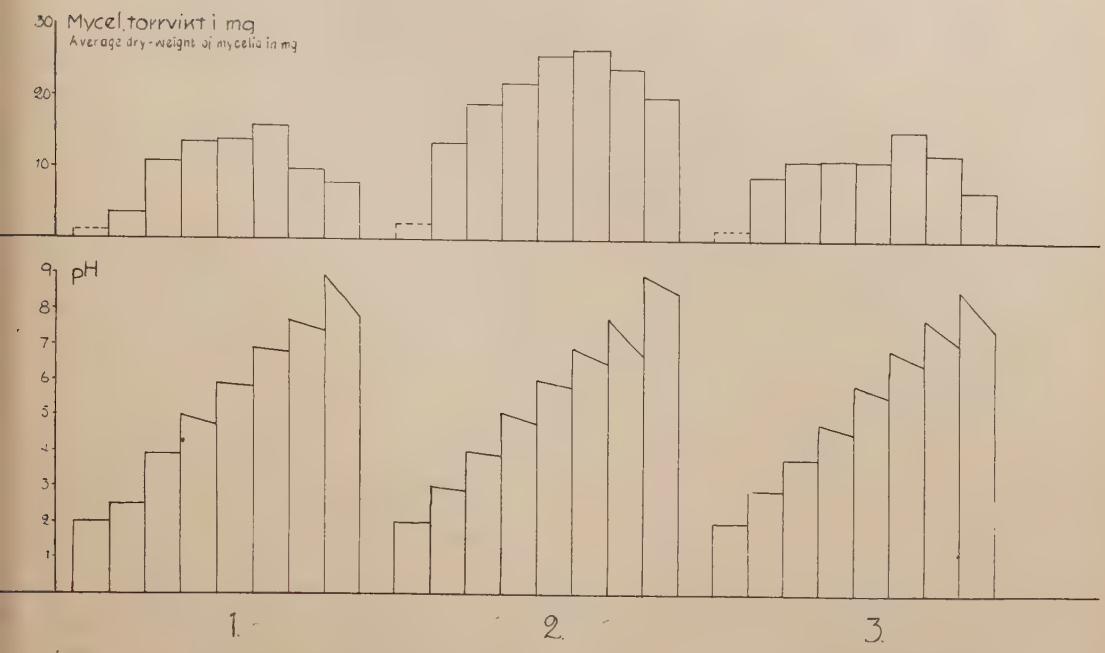


Fig. 2. Sambandet mellan myceltillväxt och substratets vätejonskoncentration. Diagram från tre försök. pH-förskjutningen under försökets gång uttryckes genom den m. el. m. starka lutningen hos pH-staplarnas övre begränsningslinjer.

The relation of the mycelial growth to the hydrogen-ion concentration of the culture medium. Diagrams from three experiments. The changes in pH during the course of the experiment will be seen from the more or less steep inclination of the upper border lines of the pH piles.

Konidiebildning förekom i samtliga kulturer från pH 4 (undantagsvis pH 3) och uppåt. Konidiebildningens livlighet tycktes huvudsakligen vara beroende av den omfattning, i vilken mycelen nått vätskeytan, och stod tillsynes ej i något bestämt samband med H-jonskoncentrationen i närlösningen.

Vid en försökstid av 6—9 dagar och en temperatur under 25° C var pH-förskjutningen i närlösningarna, som överallt gick i sur riktning, under försökets gång relativt måttlig. I de suraste lösningarna var pH konstant eller hade på sin höjd minskats med någon tiondels enhet. Med avtagande surhetsgrad ökades förskjutningens storlek för att i de från början mest alkaliska närlösningarna nå värdet 1 eller något mer. Vid ett begynnelse-pH av 7 och däröver åstadkommes denna surgörning av substratet som tab. 2 visar åtminstone delvis genom svampens produktion av oxalsyra (påvisad med gipslösning efter tillsats av soda och surgörning med ättiksyra). Vilka faktorer, som f. ö. spela in har ej närmare undersökts; på grund av näringslösningarnas växlande sammansättning kan man förmoda, att

Tab. 2. *Förekomst av oxalsyra, »slem»-bildning och gulfärgning av kulturvätskan vid odling av M. anisopliae i närlösningar med olika H-jonskoncentration.*

Presence of oxalic acid, »mucus» formation, and yellowing of the culture medium by growth of *M. anisopliae* in nutrient solutions of different H-ion concentrations.

pH vid försökets början Original pH	Oxalsyra Oxalic acid	»Slem»-bildning »Mucous» production	Gulfärgning av kulturvätskan Yellowing of the nutrient solution
2	—	—	—
3	—	×	××
4	—	×××	×××
5	—	×××	×××
6	(×)	×××	×
7	××	×	—
8	×××	—	—
9	××	—	—

flera olika syrbildande processer äga rum (Jfr MOLLIARD). Vid högre temperaturer eller om försökstiden förlängdes, erhölls i de lösningar, som från början ställts in på pH 5 eller högre, slutvärden, som högst avsevärt skilde sig från de ursprungliga. Oavsett utgångsläget pressades nämligen pH ned mot värden omkring 4,0, vid vilken gräns de surgörande krafterna tycktes göra halt.[1] I de från början surare närlösningarna var däremot pH-förskjutningen fortfarande mycket obetydlig.

I pH-området 3—7 voro vidare de submersa delarna av svampkolonierna inhöljda i stora mängder av ett slemmigt ämne av ej närmare undersökt natur och i samband därmed fick kulturvätskan en tunt sirupsartad konsistens. Slemmigheten var särskilt framträdande vid pH 4—6 och försvårade avsevärt tillvaratagandet och torkningen av mycelen. Synbarligen utan direkt samband med förekomsten av denna slemmiga substans var den gulfärgning av kulturvätskan, som regelbundet uppträdde inom pH-området 3—6. Gulfärgningen var starkast vid pH 4—5, svagast vid pH 6. Mycelet var genomgående ofärgat. En översikt över förekomsten av oxalsyra, »slem»-bildning och gulfärgning av kulturvätskan gives i tabell 2.

[1] Gäller endast detta substrat. Utgöres kvävekällan av ammoniumsalter av starka syror, kan pH sjunka till betydligt lägre värden.

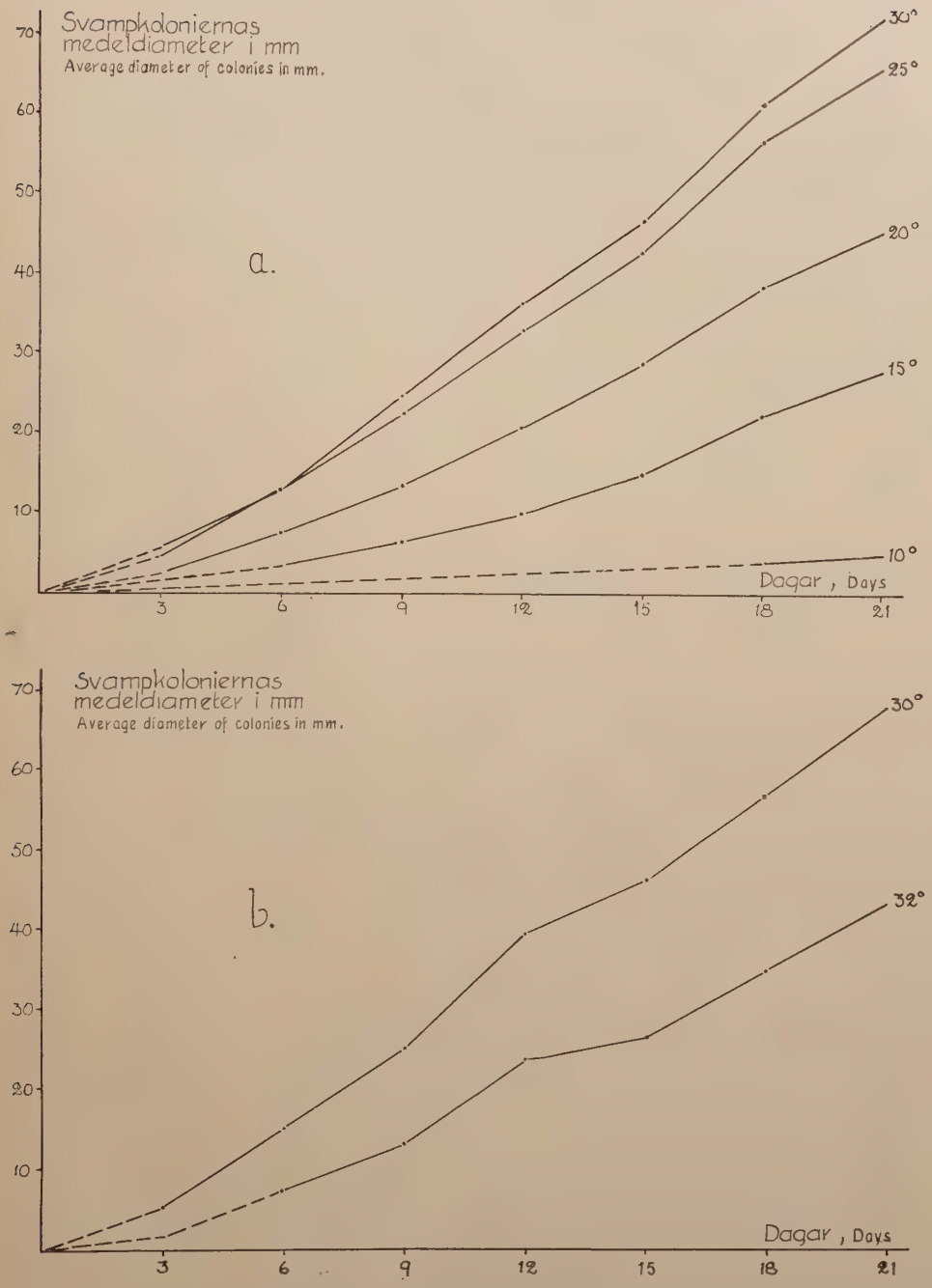


Fig. 3. Myceltillväxten på maltextraktagar vid olika temperaturer.
The mycelial growth on malt extract agar at different temperatures.

III. Temperaturens inverkan på tillväxten.

Som substrat användes maltextraktagar i petriskålar. Plattorna ympades i centrum med en mycket liten droppe av en stark konidiesuspension och sattes därefter 5 och 5 i på olika temperaturer inställda termostater. Var tredje dag mättes koloniernas diameter i två mot varandra vinkelräta riktningar. Medeltalet av de sålunda från varje koloni erhållna tvenne värdena har använts som mått på tillväxten.

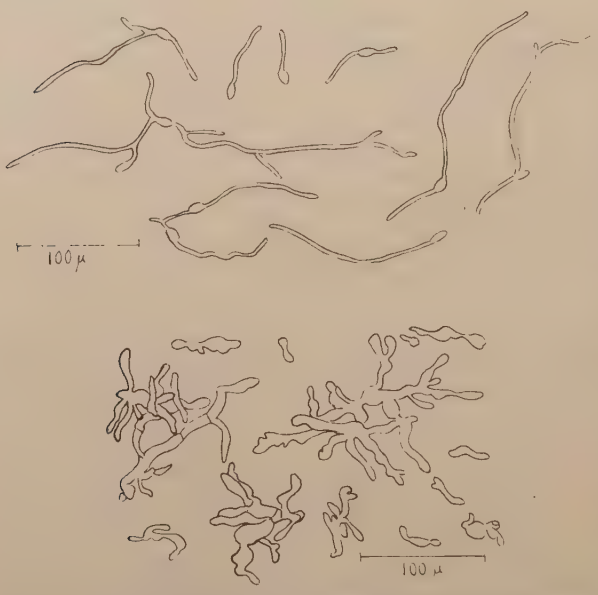


Fig. 4. Konidiernas groning på maltextraktagar vid 30° C (a) och vid 35° C (b).

Germination of the conidia on malt extract agar at 30° C (a) and at 35° C (b).

Undersökningen utfördes i två omgångar. I den första voro de nio termostaterna inställda med 5°-intervaller från 0° till 40° C. I den andra undersöktes speciellt det kritiska området mellan 30° och 35° i fyra termostater inställda på resp. 30°, 32°, 34° och 35° C. Termoregleringen arbetade i samtliga termostater med en noggrannhet av ± 0,5°.

Försöksresultaten äro grafiskt återgivna i fig 3 och 5. Varje på kurvorna markerad punkt representerar ett medeltal erhållit från 5 parallellkulturer. (Den inbördes variationen mellan parallellkulturerna var högst obetydlig.)

I 0°- och 5°-termostaterna hade ännu efter 21 dagar ingen tillväxt ägt rum. Konidierna voro dock oskadade, och när skålarna vid nämnda tidpunkt flyttades över till en temperatur av 20°. började efter få dagar en normal mycelutveckling. Vid 10° kunde man efter 12 dagar med blotta ögat iakttaga en begynnande hyftillväxt, men först efter 18 dagar hade kolonierna nått mätbar storlek, och ännu den 21. dagen var diametern icke över 5 mm (fig. 3 a). Med varje högre 5°-intervall ökades tillväxthastigheten avsevärt ända till 30°, vid vilken temp. kolonierna efter 21 dagar ägde en genomsnittlig diameter av 73 mm. Vid 35° och 40° var tillväxten lika med noll och konidierna synbarligen döda; någon tillväxt inträffade nämligen icke när skålarna flyttades över till 20°. Att konidierna dött behöver dock icke nödvändigtvis tillskrivas en direkt temperaturpåverkan utan beror kanske snarare på den kraftiga uttorkningen av substratet vid dessa högre temperaturer. (Jfr nedan.)

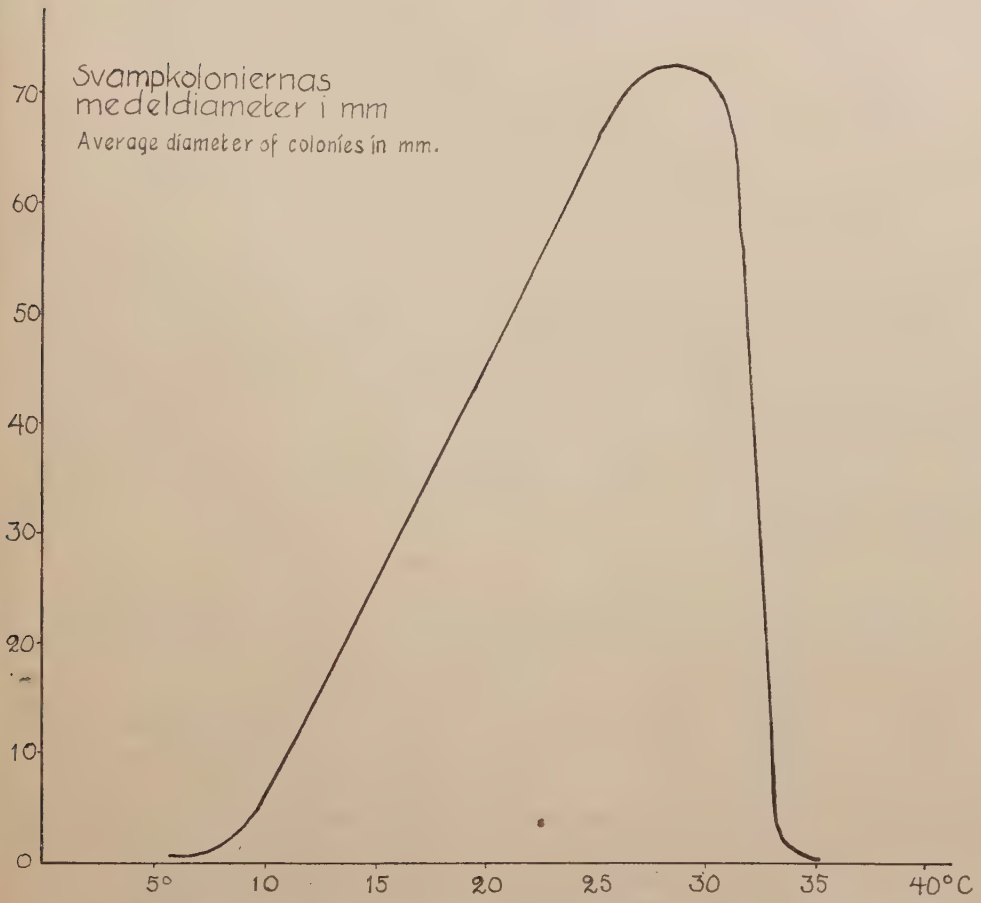


Fig. 5. Sambandet mellan temperatur och myceltillväxt på maltextraktagar. Försökstid: 21 dagar.

The relation of the mycelial growth to the temperature. Culture medium: malt extract agar. Duration of experiment: 21 days.

I den andra försöksomgången erhölls vid 30° praktiskt taget samma tillväxtkurva som i den första (fig. 3 b.). Redan vid 32° förelåg emellertid en tydlig sänkning av tillväxthastigheten. Samtidigt uppträdde här och var i kolonierna »sektorialmutationer», d. v. s. vissa sektorer fingo ett mot kolonien i övrigt avvikande utseende ifråga om färg, luftmycelets utveckling, konidiebildning o. s. v. Företeelser av denna art uppträdde ej i något fall vid de lägre temperaturerna och få alltså anses vara värmebetingade. Ytterligare exempel på att icke endast tillväxthastigheten utan även formbildningen påverkas av de supraoptimala temperaturerna lämna de kulturer, som ställts vid 34° och 35°. I dessa skedde ingen för det obeväpnade ögat märkbar tillväxt, men granskning i mikroskop visade, att en groning ägt rum, ehuru utvecklingen avstannat på ett tidigt stadium och groddmycelen

fått ett särdeles abnormt utseende med uppsvällda, oregelbundet formade hyfer (fig. 4). Efter överföring till 20° började emellertid dessa abnorma mycel ånyo växa och utvecklades till helt normala *Metarrhizium*kolonier.

Konidiebildning ägde rum i samtliga kulturer mellan 15° och 32° och i regel med en mot mycelens utveckling svarande intensitet. I 32°-kulturerna var dock konidiebildningen i de »muterande» sektorerna ofta mycket sparsam.

Om tillväxthastigheten på grundval av de sålunda gjorda erfarenheterna framställes som en funktion av temperaturen, erhålles den i fig. 5 avbildade kurvan. Från en undre tillväxtgräns vid eller strax under 10° visar kurvan en jämn stigning till optimum, som ligger mellan 25° och 30°, sannolikt vid 28° à 29°. Därifrån stupar kurvan brant ned mot den övre tillväxtgränsen, belägen någonstädes mellan 32° och 34°, varvid dock är att märka, att redan vid 32° vissa temperaturbetingade tillväxtstörningar göra sig märkbara.

IV. Tillväxten i närlösningar med olika kol- och kvävekällor.

A. Försök med olika kolkällor.

I dessa undersökningar ha medtagits ett trettiotal kolkällor, representerande viktigare grundtyper av C-haltiga kemiska föreningar (kolhydrater, alkoholer, aminosyror o. s. v.). Flertalet tillhöra vad man skulle kunna kalla ett laboratoriums standardutrustning för beredning av svampsubstrat. I några fall ha mera speciella synpunkter fått göra sig gällande.

Som parasit på insekter kommer *M. anisopliae* i beröring med bl. a. kitin och fettämnen, substanser som mera sällan äro föremål för undersökningar av detta slag. Om svampars förmåga att angripa insektskitin veta vi överhuvudtaget rätt litet. Vad *M. anisopliae* beträffar visar den mikroskopiska granskningen av infekterade insekter, att hyferna jämförelsevis lätt kunna tränga igenom kitinhuden (se ex. Notini, detta Meddel. s. 13 ff). Det är emellertid icke utan vidare klart, om svampen därvid angriper även det egentliga kitinet eller endast de i kitinstommen inlagrade substanserna av annat slag. Ett svar på frågan borde kunna erhållas genom undersökning av svampens förhållande i renkultur till insektskitin, där de beledsagande substanserna avlägsnats. Det har vidare visat sig att *M.*-hyferna under sitt framträngande i insektskroppen förete en anmärkningsvärd förkärlek för fettvävnaderna, som i första hand uppsökas och på kort tid uppfyllas av svampens hyfer. En förmodan att *M. anisopliae*, samtidigt som den lätt låter odla sig på diverse olika substrat, skulle vara speciellt inställd på fetter som kolkälla låg nära till hands och föranledde en

närmare prövning av svampens förhållande till såväl naturliga fetter som fettsyror och fettsyrade alkalisalter.

Den form i vilken kvävet tillföres har i många fall en avgörande betydelse för svamparnas förmåga att tillgodogöra sig en viss kolkälla och försöken ha därför utförts i parallella serier med ammoniumnitrat resp. asparagin som kvävekällor. (Teoretiskt riktigare kanske hade varit med tre parallella serier med resp. ammonium-, nitrat- och aminokväve.)

Kitinet och naturfetterna förbereddes på följande sätt.

Kitin. Täckvingar av kastanjeborre (*Melolontha hippocastani)* kokades i flera ombyten vatten, torkades och extraherades med eter. Behandlades därefter med 5 % saltsyra 2 tim. på vattenbad. Behandlingen upprepades under ombyte av saltsyra tre gånger. Till sist uttvättades syran genom upprepad kokning med dest. vatten.

På liknande sätt bereddes kitin även ur huden av trädödarefjärilens larver (*Cossus cossus).*

Smörfett (vanligt matsmör) renades genom kokning med dest. vatten. Efter kokningen avkyldes fettet snabbt till fast konsistens. Förfarandet upprepades fem gånger.

»Cossusfett» framställdes ur *Cossus*larver. De utpreparerade sammanhängande fettvävnaderna av dylika larver befriades genom tvättning i kallt vatten från vidhäftande kroppsvätska o. dyl. och kokades därefter 10—15 min. i dest. vatten. Efter avsvalning extraherades vattnet jämte de fasta beståndsdelarna med flerdubbla mängden koltetraklorid. Extraktet filtrerades och indunstades på vattenbad. Indunstningsåterstoden tvättades genom upprepad kokning med dest. vatten. Som slutprodukt erhölls en trögflytande, svagt gulaktig olja med »fet» lukt.

Närlösningarna sammansattes genom blandning av 3 delar buffertlösning, 1 del »grundlösning» och 1 del kolkälla i femdubbelt koncentrerad vattenlösning (i vatten svårlösliga ämnen invägdes direkt i kulturkolvarna; i dessa fall tillsattes 1 del dest. vatten).

Buffertlösning:

KH_2PO_4,	m/15 lösn.	600 cm³
NA_2HPO_4,	» »	900 cm³

Grundlösningarna voro två. Som gemensamma beståndsdelar innehöllo de:

$MgSO_4$, $7H_2O$	2,5 g
$FeCl_3$, 1-%ig lösn.	10 droppar
Jästextrakt	5 cm³
Dest. vatten	1000 cm³

Lösning A innehöll dessutom 2,5 g NH_4NO_3, lösning B 4,2 g asparagin (= samma mängd kväve i båda lösningarna).

Samtliga kolkällor prövades i ett förberedande försök i koncentrationerna 0,1, 0,5 och 2 %. Det befanns, att flertalet utan olägenheter kunde användas i koncentrationen 2 %. De övriga hade i högre koncentrationer en m. el. m. utpräglad giftverkan (ex. smörsyra) eller bildade geler av grötartad konsistens, som försvårade tillvaratagandet av mycelen (Na-stearat, K-palmitat), och tillfördes därför i sådana mängder att den slutliga koncentrationen blev 0,1 resp. 0,5 %.

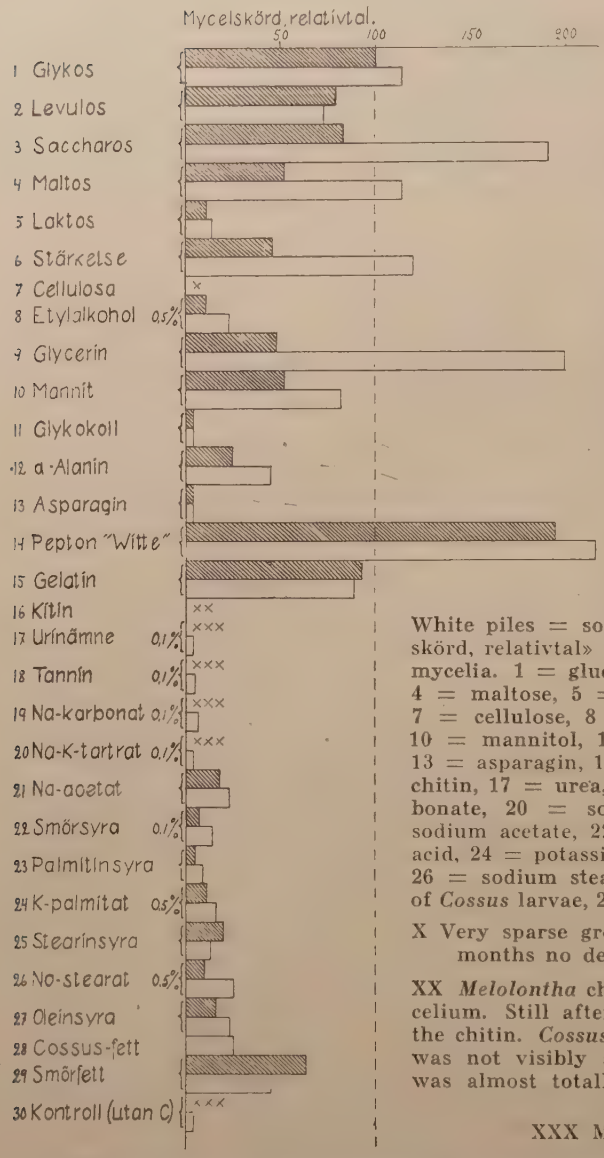


Fig. 6. Myceltillväxten i närlösningar med olika C-(och N-)källor. Randiga staplar = N-källa ammoniumnitrat, helvita staplar = N-källa asparagin.

X Ytterst sparsam utveckling av mycel. Ännu efter 3 månader ingen nedbrytning av cellulosan.

XX *Melolonth*akitin: Ytterst sparsam utveckling av mycel. Ännu efter 3 månader ingen nedbrytning av kitinet. *Cossus*kitin: Efter 14 dagar var kitinet ej märkbart angripet men efter 3 månader nästan fullständigt upplöst. Tämligen obetydlig utveckling av mycel.

XXX Inga vägbara mycelmängder.

The mycelial growth in nutrient solutions with different sources of C (and N). Striped piles = source of N: ammonium nitrate. White piles = source of N: asparagin — »Mycelskörd, relativtal» = average relative dry-weight of mycelia. 1 = glucose, 2 = laevulose, 3 = sucrose, 4 = maltose, 5 = lactose, 6 = starch (soluble), 7 = cellulose, 8 = ethyl alcohol, 9 = glycerol, 10 = mannitol, 11 = glucocoll, 12 = α-alanin, 13 = asparagin, 14 = peptone, 15 = gelatin, 16 = chitin, 17 = urea, 18 = tannin, 19 = sodium carbonate, 20 = sodium-potassium tartrate, 21 = sodium acetate, 22 = butyric acid, 23 = palmitic acid, 24 = potassium palmitate, 25 = stearic acid, 26 = sodium stearate, 27 = oleic acid, 28 = fat of *Cossus* larvae, 29 = butter fat, 30 = check (no C).

X Very sparse growth of mycelium. Still after 3 months no decomposition of the cellulose.

XX *Melolontha* chitin: Very sparse growth of mycelium. Still after 3 months no decomposition of the chitin. *Cossus* chitin: After 14 days the chitin was not visibly attacked, but after 3 months it was almost totally decomposed. Mycelial growth rather slight.

XXX Mycelia not weighable.

De färdigblandade närlösningarna steriliserades genom autoklavering. Ifråga om vissa kolkällor tillämpades dock speciella förfaranden. Av etylalkohol och av smörsyra, som på grund av sin flyktighet ej lämpa sig för autoklavering, erhöllos sålunda sterila lösningar direkt genom utspädning av de koncentrerade vätskorna med sterilt destillerat vatten. Vidare steriliserades tanninlösningarna, som synbarligen förändras mycket starkt vid autoklavering, medelst filtrering genom Berkefeldfiltrum. Kitinet autoklaverades skilt från den övriga närlösningen.

Genom tillsatsen av buffertlösning reglerades närlösningarnas pH till ett utgångsläge (efter autoklaveringen) omkring 7 (något högre för lösningar innehållande Na-karbonat och fettsyrade alkalisalter).

Vid tillvaratagandet av de mycel, som vuxit på de »feta» substraten, måste ett särskilt förfarande tillämpas för att avlägsna de starkt vidhäftande fetterna och fettsyrorna. De på mässingsnät uppfångade mycelen tvättades med rinnande varmt vatten och torkades på vanligt sätt först vid rumstemperatur och sedan i ugn på filtrerpapper. Återstående fett och fettsyror löstes därefter ut under två dygns behandling med eter. Det kunde givetvis icke undvikas att samtidigt även en del av de inuti hyferna befintliga eterlösliga omsättningsprodukterna gingo förlorade. I särskilda kontrollförsök fastställdes emellertid, att de sålunda uppkomna förlusterna ej uppgå till mer än 0,5—3,5 % av mycelvikten och följaktligen ej på något väsentligt sätt inverka på slutresultaten.

För en fullständig karakteristik av ett ämnes värde som kolkälla skulle bl. a. krävas, att man angåve icke endast den under en viss tidsperiod producerade mängden mycel utan även den s. k. ekonomiska koefficienten, alltså förhållande mellan denna mycelmängd och mängden samtidigt förbrukad kolkälla. För de undersökningar det här är fråga om är emellertid ämnesomsättningens ekonomi av mindre betydelse. Det huvudsakliga intresset gäller, vilka kolkällor överhuvudtaget svampen kan utnyttja och vilka av de möjliga kolkällorna, som tillåta en snabb och kraftig mycel- (och konidie-)produktion. Mätningen av försöksresultaten har därför inskränkts till bestämning av torrvikten av de under försökstiden bildade mycelen. Här framläggas resultaten i diagrammet fig 6, som uppställts med ledning av de relativa skördetalen (mycelskörden på glykos i A-serien = 100; relativtalen hänföra sig för varje kolkälla resp. koncentration av kolkälla till medelvikten av tre parallellkulturer.)

Redan en hastig överblick av fig. 6 ger vid handen, att de båda försöksserierna i stort sett utfallit på ett likartat sätt, men också att i vissa avseenden avsevärda skiljaktigheter föreligga. Sålunda ligga mycelvikterna med få undantag högre i B-(asparagin-)serien än i A-(ammoniumnitrat-) serien. I åtskilliga fall är denna tillväxtökning endast skenbar och beror på att kvävekällan (asparaginet) samtidigt tjänstgjort som kolkälla. Den härav betingade, i och för sig obetydliga mycelutvecklingen har rent additativt kommit att medföra en ökning av skördesiffrorna, som särskilt tydligt märkes, där den egentliga kolkällan ensam icke räckt till för att framställa någon kraftigare tillväxt. I övrigt är emellertid denna förklaring icke tillfyllest, exempelvis beträffande mycelvikterna på saccharos, stärkelse, glycerin och mannit, som till 100 % och mer överträffa dem i A-serien. Här ligger det närmast till hands att sätta såväl den absoluta viktsökningen som de förändrade relationerna mellan de på olika kolkällor producerade mycelmängderna i samband med den form i vilken kvävet erbjudits svampen. Det förefaller som om asparaginkvävet skulle vara lättare tillgängligt för svampen och möjliggöra ett intensivare utnyttjande av isynnerhet vissa kolkällor. (Jfr även de speciella försöken med kvävekällor.)

Som ett slags medelvärde av de båda försöksserierna framgår, att fler-

talet kolhydrater jämte de fleratomiga alkoholerna, pepton och gelatin visat sig vara goda kolkällor. Fetterna och närbesläktade substanser komma i andra hand. Cellulosa,[1] urinämne, tannin, Na-karbonat och Na-K-tartrat kunna praktiskt taget ej alls tillgodogöras av svampen och i koncentrationer över 0,1 % ha samtliga de sist uppräknade utom cellulosa haft en påtaglig giftverkan. Detsamma gäller smörsyra och i koncentrationer över 0,5 även etylalkohol.

I båda serierna har den snabbaste tillväxten erhållits i de närlösningar, som innehållit pepton. Pepton kan dock icke sägas vara fullt jämförbart med övriga kolkällor, då dels dess höga kvävehalt säkerligen spelar in på försöksresultaten, dels pepton icke är en enhetlig kemisk förening utan erbjuder svampen en hel uppsättning aminosyror m. m., som sannolikt till en del utan föregående bearbetning kunna direkt användas för svampens uppbyggnadsarbete. Med enbart en enkel aminosyra som kolkälla var tillväxten däremot tämligen trög (α-alanin) eller ytterst obetydlig (glykokoll, asparagin). Etylalkohol kan tydligen assimileras, men dess näringsvärde uppväges redan vid förhållandevis låga koncentrationer av dess giftverkan. Ifråga om de fleratomiga alkoholerna, glycerin och mannit, fäster man sig särskilt vid de höga mycelskördar, som erhållits med asparagin som kvävekälla; glycerin får under sådana förhållanden betraktas som en av de allra bästa kolkällorna bland de undersökta substanserna. Även ifråga om kolhydraternas utnyttjande spelar kvävekällans art en mycket stor roll, isynnerhet gäller detta saccharos, maltos och stärkelse, medan glykos och levulos tillgodogjorts i ungefär samma utsträckning i båda försöksserierna. Laktos är synbarligen som kolkälla för denna svamp betydligt underlägsen övriga prövade kolhydrater.

Frågan om kitinets nedbrytande är värd ett särskilt omnämnande. När försöken vad de övriga kolkällorna beträffar avbrötos efter 14 dagar (kitin ingick endast i A-serien) voro kitinstyckena klädda med en gles hyfvegetation föga kraftigare än den i kontrollkolvarna. Den mikroskopiska undersökningen visade knappast några tecken på att nedbrytning av kitinet ägt rum. Kitinstyckena voro visserligen glest genomvävda av hyferna men dessa trängde så gott som uteslutande fram mellan de lameller, av vilka kitinhuden är uppbyggd, och tillsynes utan att ha kemiskt påverkat substansen i lamellerna (fig. 7 a). Kulturerna fingo emellertid stå kvar och granskades ånyo först efter 3 månader. *Melolontha*kitinet var då fortfarande alldeles opåverkat. Av *Cossus*kitinet återstod däremot endast en geléaktig (sedermera i fixeringsvätskan och vid paraffininbäddningen till större delen bortlöst) massa, rikt genomvävd av hyfer, som genom sin del-

[1] = filtrerpapper (Munktell's Nr 00). Ännu efter 3 mån. kunde varken makro- eller mikroskopiskt någon nedbrytning av cellulosan påvisas. Filtrerpapperen voro överdragna av en mycket gles hyfvegetation ungefär likartad med den i kontrollkulturerna utan C.

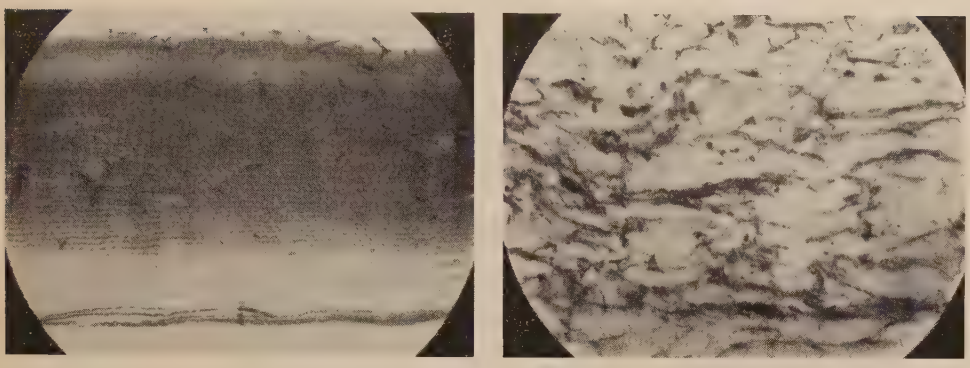


Fig. 7. Nedbrytning av *Cossus*kitin efter 14 dagar (a) och efter 3 månader (b). Först. 210 ×.

Decomposition of *Cossus* chitin after 14 days (a) and after 3 months (b). — 210 ×.

vis bibehållna parallella anordning fortfarande erinrade om skiktningen i det ännu intakta kitinet (fig. 7 b). Det är alltså tydligt att *M. anisopliae* har förmåga att effektivt nedbryta vissa men ej alla slag av insektskitin, fastän denna nedbrytning åtminstone under laboratorieförhållanden går ytterst långsamt.

Med fetter, fettsyror eller fettsyrade alkalisalter som kolkällor erhöllos genomgående ganska små mycelskördar. *M. anisopliae* tycks i detta hänseende förhålla sig på samma sätt som *Aspergillus niger* — efter allt att döma den enda svamp, som varit föremål för exaktare undersökningar beträffande sitt förhållande till fetter och fettsyror. Flieg konstaterade i sin undersökning över *A. niger*, att denna svamp växte mycket långsamt på fetter och fettsyror. Mot denna låga intensitet i fettomsättningen stodo emellertid mycket höga värden på den ekonomiska koefficienten. Trots den tröga myceltillväxten kunde alltså fetterna, om man tänker på ämnesomsättningens »ekonomi», betraktas som värdefulla kolkällor. Av *M. anisopliae* erhöllos jämförelsevis höga skördesiffror på smörfett och *Cossus*-fett, f. ö. voro skillnaderna i mycelskörd för små och resultaten i de båda försöksserierna icke tillräckligt entydiga för att en gradering av tillväxten på de olika fettartade substanserna skall var av värde.

Svampen bildade konidier på alla substrat, där luftmycel utvecklades, d. v. s. samtliga med undantag av dem, som innehöllo cellulosa, urinämne, tannin, Na-karbonat, Na-K-tartrat och smörsyra. På etylalkohol, glykokoll, asparagin och (efter längre tid) kitin producerades dock mycket obetydliga konidiemängder och på fetterna (jämte fettsyrorna och deras salter) var konidiebildningen tämligen svag. Rikligare konidiebildning förekom endast i samband med en kraftig myceltillväxt och som de uppskattningsvis gynnsammaste kolkällorna för konidieproduktionen framstodo glykos, saccharos, glycerin, pepton och gelatin. Allra livligast var måhända koni-

diebildningen på pepton samtidigt som konidierna på denna kolkälla, liksom i viss grad även på gelatin, fingo en avsevärt mörkare färg än eljest. B-serien avvek genom överlag något rikligare konidiebildning och något mörkare färgade konidier från A-serien. Ett undantag utgjorde peptonkulturerna, som i nämnda avseenden voro ungefär lika i bada serierna.

B. Försök med olika kvävekällor.

Sambandet mellan myceltillväxten och kvävekällans beskaffenhet studerades i försök analoga med kolkälleförsöken. Närlösningarna voro sammansatta av 3 delar buffertlösning, 1 del grundlösning och 1 del kvävekälla (femdubbelt koncentrerad vattenlösning; endast kitinet tillfördes i fast form under tillsats av 1 del dest. vatten). Buffertlösningen var densamma som i kolkälleförsöken. Grundlösningarna vora två, A och B, med följande gemensamma beståndsdelar:

$MgSO_4 7H_2O$	2,5 g
$FeCl_3$, 1 %ig lösn.	10 droppar
Dest. vatten	1000 cm^3

A-lösningen innehöll därjämte 2 % glykos, B-lösningen 2 % glycerin. Jästextraktet utelämnades i dessa försöksserier för att icke extraktet genom sin kvävehalt skulle interferera med de egentliga kvävekällorna. Mängden kvävekälla avvägdes i vart fall så att den slutliga koncentrationen skulle motsvara 0,013 % N (= 0,05 % NH_4Cl). Pepton och gelatin, vilkas kvävehalt ej var exakt känd, tillfördes i 0,5 % lösning (= 0,1 % slutlig koncentration). De färdigberedda lösningarna steriliserades genom autoklavering.

Försöken avbrötos efter 9 dagar. Resultaten belysas av diagrammet fig. 8.

Samtliga undersökta substanser befunnos användbara som kvävekällor för *M. anisopliae*. Betecknande nog kan kvävet lätt avspjälkas även från sådana ämnen som glykokoll, asparagin och urinämne, vilka som kolkällor endast obetydligt eller ej alls kunde tillgodogöras av svampen. I båda försöksserierna gav asparagin (i B-serien jämte alanin) de största mycelskördarna och överhuvudtaget var tillväxten vid närvaro av organiska kvävekällor med få undantag (glykokoll; alanin i A-serien) livligare än när kvävet erbjöds som ammonium- eller nitratjoner. Ammoniumsalter och nitrater förefalla som kvävekällor vara ungefär likvärda, såvida icke den låga skördesiffran på glycerin-KNO_3 i B-serien möjligen kan vara en antydan om att tillsammans med kolkällor av annat slag än kolhydrater nitratkvävet tillgodogöres mindre lätt än ammoniakkväve (Jfr KOSTYTSCHEW s. 232). Kitinets nedbrytning[1] hade ungefär samma förlopp som förut beskrivits. Den försiggick alltså till en början i knappt märkbar takt under obetydlig mycelbildning men ökade så småningom något och hade efter 3 månader lett till att kitinstyckena så gott som helt upplösts medan svampen omgav resterna med en gles mycelpäls.

[1] I detta försök ingick endast *Cossus*kitin.

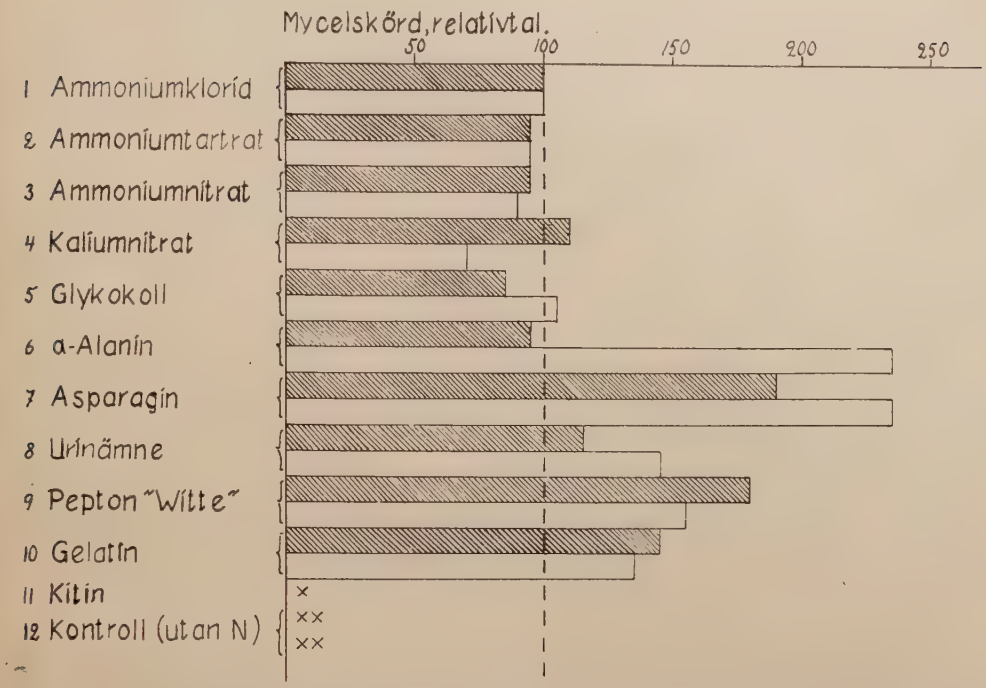


Fig. 8. Myceltillväxten i närlösningar med olika N-(och C-)källor. Randiga staplar = C-källa glykos, helvita staplar = C-källa glycerin.

X Kitinet (*Cossus*-) efter 9 dagar ej märkbart angripet men efter 3 månader nästan fullständigt upplöst. Tämligen obetydlig utveckling av mycel.

XX Inga vägbara mycelmängder.

The mycelial growth in nutrient solutions with different sources of N (and C). Striped piles = source of C: glucose. White piles = source of C: glycerol. — »Mycelskörd, relativtal» = average relative dry-weight of mycelia. 1 = ammonium chloride, 2 = ammonium tartrate, 3 = ammonium nitrate, 4 = potassium nitrate, 5 = glucocoll, 6 = α-alanin, 7 = asparagin, 8 = urea, 9 = peptone, 10 = gelatin, 11 = chitin, 12 = check (no N).

X After 9 days the chitin (of *Cossus* larvae) was not noticeably attacked, but after 3 months it was almost totally decomposed. Mycelial growth rather slight.

XX Mycelia not weighable.

Asparaginkulturerna avveko något från de övriga genom konidiernas en aning mörkare färg (Jfr A- och B-serierna i kolkälleförsöken) men f. ö. förelågo ifråga om konidiebildningen inga mera framträdande skillnader, som kunde ställas i relation till kvävekällorna.

V. Svampens beroende av tillväxtfaktorer.

Några enkla vägledande försök på ett tidigt stadium hade visat att *M. anisopliae* åtminstone under någon tid kunde växa i en närlösning innehållande enbart mineralsalter och tillväxtfaktorfria kolkällor men att till-

växten gynnades något vid tillsats av små mängder jäst- eller maltextrakt. För att så att säga vara på den säkra sidan lät jag därför mindre mängder jästextrakt ingå i de för pH- och kolkälleförsöken använda närlösningarna. I syfte att få ett exaktare svar på frågan om svampens beroende av tillväxtfaktorer utförde jag emellertid till slut följande försök.

Försök 1. Myceltillväxten i närlösningar med och utan tillsats av jästextrakt.

Närlösningen var densamma som i kolkälleförsöken med grundlösning A (s. 71) och 2 % glykos.

Jästextraktet bereddes på följande sätt: 100 g pressjäst autoklaverades med 200 cm^3 dest. vatten. Det efter avsvalning överstående klara, gulfärgade extraktet pipetterades över på sterila flaskor att användas vid behov. Torrämneshalten i ett dylikt extrakt bestämdes till 0,34 %.

Halva antalet kolvar erhöll en tillsats av 1 cm^3 jästextrakt i utspädning 1:25 (= 0,2 % jästextrakt i närlösningen), de övriga 1 cm^3 dest. vatten. Varje kolv ympades med en liten droppe (platinaögla) konidiesuspension. Fr. o. m. 6. dagen togos 5 kolvar av varje serie varannan dag för vägningen av mycelskörden.

Tab. 3. *Myceltillväxten i närlösningar med och utan jästextrakt.*
Mycelial growth in nutrient solutions with and without yeast extract.

Försökstid dagar Incubation in days	Mycel, torrvikt i mg Dry-weight of mycelium in mg	
	Utan jästextrakt Without yeast extract	Med jästextrakt With yeast extract
6	2,7 ± 0,5	6,9 ± 2,3
8	18,5 ± 1,7	25,5 ± 2,5
10	22,9 ± 1,7	33,1 ± 2,2
12	38,6 ± 5,5	42,2 ± 0,6
14	56,9 ± 4,2	59,4 ± 1,2
16	55,7 ± 5,5	61,7 ± 2,9
18	65,5 ± 3,7	59,9 ± 3,1
20	70,2 ± 2,0	67,8 ± 4,8

Som tab. 3 och tillväxtkurvan fig. 9 visa gåvo de kulturer, som erhållit tillsats av jästextrakt hela tiden t. o. m. 16. dagen högre skördemedelvärden än de som icke erhållit sådan tillsats. Skördemedelvärdena äro dock genomgående behäftade med ganska stora medelfel och endast ifråga om tiodagarsvärdena kan man med bestämdhet hävda att säkra skillnader föreligga. Konidiebildningen var uppskattningsvis rikligare och konidiernas färg starkare i kulturerna med jästextrakt än i de övriga.

I ett annat liknande försök utövades en visserligen obetydlig men säkert konstaterbar, stimulerande verkan av »*Cossus*extrakt» (mycelskörd i kontrollkulturerna 12,2 ± 0,2 g., i kulturerna med extrakt 13,3 ± 0,2 g) medan pepton (som uppges vara rikt på tillväxtfaktorer) i en koncentration av 0,02 % och aneurin (= vitamin B_1) i en koncentration av 1 γ per 20 cm³ närlösning icke påverkade mycelproduktionen. Maltextrakt (»Vitrum») gav i en del försök tydligt positiva utslag men var i andra verkningslöst, utan att några bestämda orsaker härtill kunde fastställas.

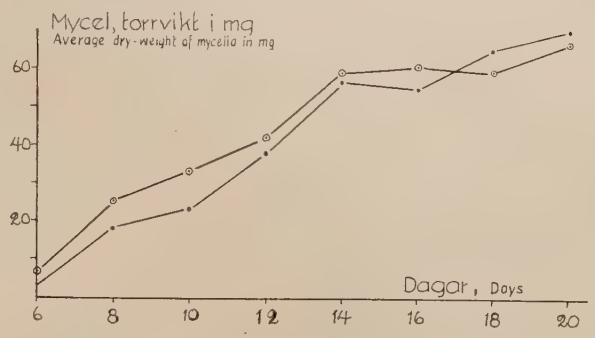


Fig. 9. Myceltillväxten i syntetisk närlösning med (o) och utan jästextrakt.

The mycelial growth in synthetic nutrient solution with (o) and without yeast extract.

Försök 2. Myceltillväxten i närlösning utan tillsats av tillväxtfaktorer. Verkan av jästextrakt tillsatt vid olika tidpunkter under växtperioden.

Närlösning: = försök 1. Ympning med konidiesuspension. Fr. o. m. 10. dagen uttogos var tionde el. tjugonde dag 10 kulturer för vägning av mycelskörden. Med anledning av den starka avdunstning, som ägt rum, erhöllo samtliga återstående kolvar efter 50 dagar 10 cm³ sterilt destillerat vatten extra.

Tre gånger under försökstiden, nämligen första, tionde och sextionde försöksdagen uttogos slumpvis 10 kulturer, som erhöllo en tillsats av 1 cm³ 4 %-igt jästextrakt vardera. I varje omgång vägdes mycelskörden 10 dagar senare.

Tab. 4 liksom fig. 10 visa att tillväxtkurvan oavbrutet steg t. o. m. 40. dagen för att därefter långsamt sjunka. En tillsats av jästextrakt åtföljdes regelbundet av en höjning av skördemedelvärdet men skillnaderna voro små och endast ifråga om 10-dagarsvärdena större än försöksfelen. I de efter 20 dagar vägda kulturerna kunde konstateras en för ögat tydligt rikligare konidiebildning och starkare färgning av konidierna efter tillsats av jästextrakt (efter 10 dagar var konidiebildningen ännu för obetydlig för att ev. skillnader skulle kunna framträda). Av särskilt intresse är att en tillsats av jästextrakt sedan kurvan börjat falla ej medförde någon väsentlig förändring av kurvans förlopp. Den avtagande tillväxten kan alltså ej ha förorsakats av brist på någon i jästextraktet ingående faktor. En enkel överslagsberäkning ger f. ö. vid handen att för ernående av de efter

[1] Extraktet, som tillvaratagits i samband med tvättningen av fettvävnaderna och kitinhuden av *Cossus*larver (jfr s. 71), torde huvudsakligen ha bestått av utspädd kroppsvätska. Det sterilfiltrerades genom ett Jenaglasfiltrum G 5/3 och var efter filtreringen mörkt svartbrunt.

40 dagar uppnådda mycelvikterna praktiskt taget all glykos måste ha tagits i anspråk (räknat med en ekonomisk koefficient av 0,3, som får anses vara ett antagbart värde med glykos som kolkälla). Tillväxten har alltså utan extra tillsats av tillväxtstimulerande ämnen fortgått tills närlösningen varit förbrukad med avseende på kolkällan. Därefter har autolys inträtt med ty åtföljande skördeminskning. (Jfr FRIES s. 123.)

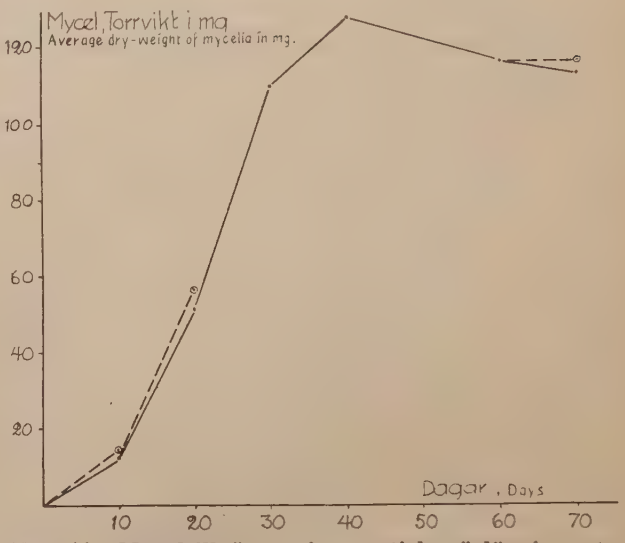


Fig. 10. Myceltillväxten i syntetisk närlösning utan tillsats av tillväxtfaktorer. Verkan av jästextrakttillsats vid olika tidpunkter under försökets gång (o).

The mycelial growth in synthetic nutrient solution without growth factors. Effect of yeast extract added at different points of time during the course of the experiment (o).

Resultaten av hithörande försök kunna alltså sammanfattas på följande sätt. *M. anisopliæ* kan utan extra tillsats av tillväxtfaktorer fullständigt utnyttja en rent syntetisk närlösning. Tillsats av små mängder jästextrakt i samband med ympningen medför en tämligen obetydlig men säkert konstaterad tillväxtökning. Tillföres jästextraktet vid en senare tidpunkt är en tillväxtökning icke utesluten men kan i alla händelser icke göra sig gällande vid sidan av försöksfelen. Oberoende av tillväxtökningen visade de med jästextrakt försatta kulturerna en något rikligare konidiebildning och kraftigare färgade konidier än de övriga. »*Cossus*extrakt» tillfört vid försökens början stimulerade tillväxten i samma grad som jästextrakt. Däremot reagerade svampen icke för tillsats av pepton (0,02 %) eller aneurin (1 γ per 20 cm^3 närlösning). Att aneurinet även i nämnda, relativt höga koncentration icke hade någon effekt torde innebära att den verksamma beståndsdelen i jästextrakt icke är det därstädes vanligen rikligt förekommande aneurinet. Vilken av jästextraktets övriga komponenter, som i så fall skulle spela in, kan icke utan vidare avgöras. Beträffande maltextraktets tillväxtstimulerande effekt ha försöken givit motsägande resultat: i vissa försök märktes en påtagligt stimulerande verkan, i andra försök erhölls ingen dylik verkan.

Tab. 4. *Myceltillväxten i syntetisk närlösning utan tillsats av tillväxtfaktorer. Verkan av jästextraktillsats vid olika tidpunkter under försökets gång.*
Growth of mycelium in a synthetic nutrient solution without growth factors. Effect of adding yeast extract at different moments of the experiment.

Försökstid dagar Incubation in days	pH vid försökets slut pH at harvest	Mycel, torrvikt i mg Dry-weight of mycelium in mg	Anmärkningar Notes
10	5,6	12,2 ± 0,2	[1]) Jästextrakt tillfört första dagen. Yeast extract added on the 1st day.
10[1])	5,2	13,3 ± 0,2	
20	5,1	51 ± 4	
20[2])	5,3	56 ± 3	[2]) Jästextrakt tillfört tionde dagen. Yeast extract added on the 10th day.
30	5,5	110 ± 4	
40	5,2	128 ± 5	
60	4,7	116 ± 5	[3]) Jästextrakt tillfört sextionde dagen. Yeast extract added on the 60th day.
70	4,4	113 ± 6	
70[3])	4,4	116 ± 5	

VI. Diskussion av försöksresultaten.

I sammanträngd form skulle resultaten av denna undersökning kunna läggas fram på följande sätt.

1) *M. anisopliae* är tämligen oberoende av substratets H-jonskoncentration och visar normal mycelutveckling och konidiebildning inom ett pH-område mellan 4 och 8 à 9 eller något däröver. Optimum ligger omkring neutralpunkten.

2) I sitt beroende av temperaturen kan svampen betecknas som jämförelsevis termofil med ett tillväxtoptimum beläget mellan 25° och 30° C och med 10° resp. 32° som ungefärliga undre och övre temperaturgränser.[1]

3) Som kol- och energikällor ha vissa vanliga kolhydrater och fleratomiga alkoholer jämte sammansatta proteinämnen som pepton och gelatin visat sig vara de lättast assimilerbara. Svampen kan även ehuru långsamt nedbryta och tillgodogöra sig fetter, fettsyror och fettsyrade alkalisalter liksom kitin, medan cellulosa, tannin, urinämne m. fl. substanser ej alls kunna utnyttjas.

[1] I detta sammanhang kan påpekas det för det praktiska utnyttjandet av svampen gynnsamma i den övre temperaturgränsens belägenhet åtskilligt under människans kroppstemperatur. Utan en rad ganska besvärande försiktighetsmått lär det inte kunna undgås, att vid massodling av svampen liksom vid själva bekämpningsarbetet de därmed sysselsatta inandas en hel del konidier. En utveckling av dessa på luftvägarnas slemhinnor skulle sannolikt bli ödesdiger men torde av försöken att döma vara utesluten vid de 37° C, som normalt råda i människokroppen.

4) Som kvävekällor kunna såväl ammoniumsalter som nitrater och aminoföreningar tjänstgöra, och svampen avspjälkar med lätthet kvävet även från sådana kvävehaltiga organiska ämnen, vilka som kolkällor ej eller endast med svårighet tillgodogöras. Aminokväve assimileras i de flesta fall lättare än ammonium- och nitratkväve. Ammoniumsalter och nitrater å sin sida äro tämligen likvärda som kvävekällor.

5) Svampen kan synbarligen själv producera de för dess normala utveckling erforderliga tillväxtfaktorerna även om i försöken tillväxten stimulerats något vid tillsats av små mängder jästextrakt eller »*Cossus*-extrakt».

6) Konidiebildningen är påtagligt stimulerad vid odling på substrat innehållande pepton eller asparagin som kvävekälla. I samma riktning verkar tillsats av jästextrakt. F. ö. gäller att de substrat, som giva de högsta mycelskördarna, också äro de gynnsammaste för konidieproduktionen.

Vouk & Klas ha så gott som genomgående gjort sina iakttagelser på kulturer i rör med agarsubstrat och grundat slutsatserna på okulära skattningar av mycelens utvecklingsgrad. Det subjektiva i en dylik skattning innebär givetvis alltid ett visst osäkerhetsmoment. Beträffande de av Vouk & Klas utförda försöken rörande kol- och kvävekällor kan man dessutom ifrågasätta om några slutsatser överhuvudtaget varit berättigade, då substraten icke varit tillräckligt definierade till sin sammansättning. Så t. ex. innehöllo substraten vid prövningen av olika kolkällor (kolhydrater) som grundingredienser bl. a. pepton och glycerin (½ % av vardera), alltså ämnen, som redan i och för sig äro förträffliga kolkällor. Om följaktligen de av Vouk & Klas anförda resultaten i många hänseenden måste anses mycket svagt grundade, kan å andra sidan konstateras, att de i stort sett fått sin bekräftelse i vad som framkommit genom mina undersökningar. Smärre avvikelser, t. ex. ifråga om tillväxtoptimum och övre temperaturgräns, sakna betydelse och kunna utan svårighet förklaras av att vi arbetat med olika biotyper av svampen, med olika substrat eller av de olika sätten för bedömning av mycelutvecklingen. Liknande synpunkter torde få anläggas även ifråga om de från mina något skiljaktiga resultat, som erhållits vid de av Notini utförda temperaturundersökningarna (jfr fig. 3 och det av Notini (1938 s. 17) återgivna temperaturdiagrammet).

Överhuvudtaget får man icke släppa ur sikte det relativa i fysiologiska undersökningar av detta slag: resultaten äga oinskränkt giltighet endast under de förhållanden, under vilka de erhållits, och i den mån de gälla försöksobjekt av samma härkomst och »förhistoria». Att denna, beträffande levande, modifierbara objekt egentligen självklara om också icke alltid tillräckligt uppmärksammade regel, icke gäller endast vid jämförelse mellan resultaten från olika undersökningar utan i ännu högre grad när det blir fråga om att från försöksresultaten sluta sig till svampens reaktionssätt i

dess naturliga miljö är givet. Miljöbetingelserna i laboratoriet komma alltid även vid ett i övrigt invändningsfritt anordnat försök att väsentligt skilja sig från de i naturen rådande. Därtill komma i många fall metodikens ofullkomligheter och det på organismens reaktionsnorm m. el. m. varaktigt modifierande inflytande, som en längre tids renkultur på konstlade substrat kan medföra. Trots att den bild av svampens fysiologi man genom laboratorieförsöken kommit fram till alltså säkerligen behöver tillrättaläggas i åtskilliga d e t a l j e r för att passa in under naturliga förhållanden, torde man dock kunna utgå ifrån att den i s t o r t s e t t har allmängiltighet. Den ovan givna sammanfattningen karakteriserar *M. anisopliae* närmast som en föga specialiserad saprofyt med förmåga att angripa såväl vegetabiliska som animaliska produkter. Som saprofytisk marksvamp begränsas dess livsverksamhet bl. a. genom ett jämförelsevis högt liggande temperaturminimum och av oförmågan att angripa viktiga humuskomponenter som cellulosa och tanniner. Någon speciell anpassning till dess roll som fakultativ insektsparasit söker man förgäves efter, även om *M. anisopliae* genom en viss termofili, ett relativt högt beläget pH-optimum och förmåga till normal utveckling även vid hög alkalitet i substratet ansluter sig till flertalet andra insektsparasiterande svampar (jfr Blochwitz). Laboratorieförsöken ha emellertid demonstrerat några av grundförutsättningarna för dess insektsparasitism. Dit hör den lätthet med vilken svampen tillgodoser sitt kol-, kväve- och energibehov genom assimilation av animaliska proteinämnen samt förmågan att nedbryta fetter och kitin. Den tröghet med vilken fettnedbrytningen försiggick i försökskulturerna står visserligen i mindre god överensstämmelse med de tidigare berörda iakttagelserna angående svampens förhållande till insekternas fettvävnader. Den livliga myceltutvecklingen i fettvävnaderna kan emellertid få sin förklaring i att svampen där möter icke endast fettämnen utan även andra assimilerbara substanser. En dylik samtidig nedbrytning av fetter och andra kolkällor har, som Flieg visat beträffande *Aspergillus niger,* till följd en anmärkningsvärd stegring av livsverksamheten utöver vad endera av näringskomponenterna ensam skulle ha betingat. Detsamma kan förmodas gälla nedbrytningen av kitinet, som ävenledes förlöpte trögt i försökskulturerna. Beträffande kitinnedbrytningen noterar man f. ö. med intresse att svampen i försökskulturerna förhöll sig olika mot kitin av olika härkomst. Medan *Cossus*kitinet visserligen långsamt men fullständigt upplöstes motstod *Melolontha*kitinet även vid långvarig påverkan svampens enzymer. Det förefaller sannolikt att försöken här givit en antydan om åtminstone en av anledningarna till att vissa insekter, däribland *Melolontha*arterna (de fullbildade djuren) ej angripas av *Metarrhizium anisopliae:* hyferna förmå ej tränga genom kitinhuden. —

Skulle det visa sig att ett utnyttjande av *M. anisopliae* i insektsbekämp-

ningens tjänst är praktiskt genomförbart blir givetvis frågan om en odling av svampen i större skala aktuell. KRASSILSTSCHIK uppgav redan för mer än femtio år sedan aktningsvärda resultat härvidlag, tyvärr dock utan att lämna mer än antydningsvisa upplysningar om det förfarande han därvid tillämpade. Tekniskt sett torde dock problemet knappast erbjuda några större svårigheter, då svampen som framgår av det föregående icke har några mera svåruppfyllbara krav på vare sig substrat eller övriga odlingsbetingelser.

ENGLISH SUMMARY.

Physiological Investigations into the Fungus of Green Muscardine.

Introduction.

The work here submitted, which was carried out from the autumn of 1940 to the spring of 1941, has arisen as a link in the investigations made at the State Plant Protection Station concerning the possibilities of utilizing *Metarrhizium anisopliae* for combating insects, and treats of the dependence of the fungus upon some important environmental factors when cultivating under laboratory conditions.

Apart from isolated particulars about suitable culture media etc., in the literature an attempt at a more methodical study of the physiology of this fungus is to be found only in VOUK & KLAS (1932).

I. *Object of Experiment. General Method.*

The object of the investigations has been a strain of *M. anisopliae* isolated by Dr. G. NOTINI, Assistant at the State Plant Protection Station. All inoculation material for the series of experiments described in the following is derived from a single-spore mycelium from this strain.

In most of the series of experiments the fungus has been cultivated in nutrient solutions in 100 cm^3 Erlenmeyer flasks of Jena glass with 20 cm^3 of nutrient solution per flask as a rule. Sterilization of the culture media has usually been effected by »momentary» autoclaving at 120° C (Cf. MELIN, p. 1063, and DAVIS & ROGERS, p. 108).

The measurements of pH have been made electrometrically by means of quinhydrone electrodes. The values of pH exeeding 7.5 have at the same time been verified with Lyphan paper.

After having tried several different inoculation processes I decided to introduce the fungus in the form of a conidia suspension in sterile water, 1 cm^3 per flask as a rule. Even with the greatest possible precision and uniformity in inoculation, it was unavoidable, however, that the parallel cultures showed proportionately great individual variations in regard to

the mycelial growth. This is evidently connected with the fortuitous distribution between surface mycelia and submerged mycelia, and the different rate of growth of these two categories of mycelia.

The growth in the liquid media was measured by weighing the mycelia dried to weight constancy at 95° C.

II. *Dependence of the Fungus upon the H-ion Concentration of the Culture Medium.*

For these investigations a series of buffer nutrient solutions with α-alanin as source of N was used according to the directions given by LINDEBERG, but with the aneurine exchanged for 0.02 % yeast extract.

Even an ocular estimation of the experiment cultures gave a rather clear picture of the relation between growth and H-ion concentration (Fig. 1). Weighing of the mycelia confirmed in the main the correctness of the ocular observations, even if the differences were found to be less marked than might have been expected (Tab. 1). The growth curves are fairly level in shape with a slightly marked maximum about pH 7 (Fig. 2). Qualitatively the dependence of the fungus upon the H-ion concentration was manifested *inter alia* by the varying development of certain metabolic products such as oxalic acid, a mucilaginous substance of a type not thoroughly examined, and a substance that stained the culture fluid yellow (Tab. 2). Development of conidia occurred in all the cultures from pH 4 and upwards. The H-ion concentration had apparently only a slight effect upon the intensity of the conidial production.

III. *Influence of the Temperature upon the Growth.*

The fungus was cultivated on malt extract agar in Petri dishes. Every third day the diameter of the colonies was measured in two directions at right angles to each other. The examination was made in two sections, on the one hand with nine thermostats adjusted at 5° intervals from 0° to 40° C, on the other with four thermostats adjusted to 30°, 32°, 34° and 35° C respectively.

The results of the experiments are graphicallly shown in Figs. 3 and 4 (each point marked on the curves represents an average of 5 parallel cultures).

Already at 32° C disturbances occurred in the development of the colonies in the form of »sectorial mutations» with divergent colour, poorer development of aerial mycelia, slighter production of conidia etc. At 34° and 35° the conidia certainly germinated, but growth soon ceased and the germ mycelia were exceedingly abnormal in appearance (Fig. 4). After having been transferred to 20° these abnormal mycelia began to grow again, however, and afterwards developed normally.

Conidia were formed in all the cultures between 15° and 32° and with an intensity corresponding to the development of the mycelia.

IV. *Mycelial Growth in Nutrient Solutions with different Sources of C and N.*

A. *Experiments with different sources of carbon.*

In these experiments about thirty sources of carbon (carbohydrates, alcohols, amine acids etc.) were tested. In consideration of the role of the fungus as an facultative insect parasite, chitin was also included among the sources of carbon.

As initial material in the preparation of the chitin elytra of *Melolontha hippocastani* and larval integuments of *Cossus cossus* were used; in both cases the chitin was freed from accompanying substances by ether extraction, digestion with 5 % hydrochloric acid in a water-bath and repeated boiling with water. It has further become evident that the fungus, when penetrating into the insect's body, shows a remarkable predilection for the adipose tissues (Notini). For this reason the relation of the fungus to different fats and to fatty acids and alkali salts of these acids has been tested. The natural fats were purified before use by repeated melting with boiling water and extraction with carbon tetrachloride.

The sources of carbon were tested in a nutrient solution that was adjusted to pH ca 7 by the addition of phosphate buffer. Besides the necessary salts the nutrient solutions contained yeast extract (0.02 %) and as source of N ammonium nitrate (series A) and asparagin (series B; the same amount of nitrogen in both series) respectively. Most of the sources of carbon were supplied in a concentration of 2 %, some, for various reasons, in lower concentrations, 0.1—0.5 %, however. Of each source of carbon or concentration of source of carbon respectively three parallel cultures were set up in each series.

The mycelial growth on the different sources of carbon will be seen from the diagram in Fig. 6, which has been drawn up with the guidance of the average relative dry-weights (the dry-weight of mycelia on glucose in series A = 100).

Regarding the chitin it should be noted that at the end of 14 days hardly any decomposition had taken place (Fig. 7 a). At the end of three months the *Melolontha* chitin was still unaffected, whereas there remained only traces of the *Cossus* chitin in the form of a jelly-like mass interwoven with hyphae (Fig. 7 b).

Abundant production of conidia occurred only in connection with vigorous mycelial growth and primarily on glucose, sucrose, gilycerol, peptone and gelatin. The production of conidia was in general more abundant with asparagin as source of N than with ammonium nitrate.

B. *Experiments with different sources of nitrogen.*

As in the case of the sources of carbon, nutrient solutions were used that were adjusted to pH ca 7 by the addition of phosphate buffer. The sources of carbon were on the one hand glucose (A) and on the other glycerine (B), both in a 2 % concentration. The amount of the source of carbon was adjusted to correspond to 0.013 % N (= 0.05 % NH_4Cl). Peptone and gelatin were added in a 0.1 % concentration. No yeast extract was added in this series.

The results of the experiments are shown in the diagram in Fig. 8.

V. *Dependence of the Fungus upon Growth Factors.*

Tables 3 and 4 as well as Figs. 9 and 10 give the results of two experiments concerning the influence of yeast extract on the mycelial growth. *M. anisopliae* can apparently without an extra addition of growth factors completely utilize a purely synthetic nutrient solution. The addition of small amounts of yeast extract in connection with the inoculation occasions a rather inconsiderable but definite increase in the mycelial weights. If the yeast extract is added at a later stage an increase in growth is not out of the question, but has not been able to make itself noticeable in the experiments collaterally with the errors of the experiments. Independently of the increase in growth the cultures supplied with yeast extract showed a somewhat more abundant production of conidia and more deeply coloured conidia than the others. The active substance in the yeast extract is not identical with aneurine (vitamin B_1), which even in such a strong concentration as 1 γ per 20 cm^3 nutrient solution did not stimulate the mycelial growth. Nor did the fungus react to the addition of small amounts of peptone (0.02 %). On the other hand, »*Cossus* extract» (mainly consisting of diluted body fluid from *Cossus* larvae) exerted an influence comparable to that of yeast extract.

VI. *Discussion of the Results of the Experiments.*

The results of this investigation may briefly be stated as follows.

1) *M. anisopliae* is fairly independent of the H-ion concentration of the culture medium and shows normal mycelial development and production of conidia within a pH range between 4 and 8 to 9 or slightly above. The optimum lies at about the neutral point.

2) In its dependence upon the temperature the fungus may be described as comparatively thermophilic with a growth optimum situated between 25° and 30° C, and with 10° and 32° respectively as approximate upper and lower temperature limits.

3) As sources of carbon and energy certain ordinary carbohydrates and

poly-atomic alcohols as also compound proteins such as peptone and gelatin proved to be most easily assimilable. The fungus can also, although slowly, decompose and utilize fats, fatty acids, and alkali salts of these acids as well as chitin, whereas cellulose, tannin, urea and other substances cannot be made use of at all.

4) Ammonium salts as well as nitrates and amino-compounds may serve as sources of nitrogen, and the fungus has no difficulty in breaking down the nitrogen even from such nitrogenous organic substances that as sources of carbon can only be utilized with difficulty or not at all. Amino-nitrogen is in most cases more easily assimilated than ammonia-nitrogen and nitrate-nitrogen. Ammonium salts and nitrates for their part are almost equivalent as sources of nitrogen.

5) The fungus can apparently itself produce the growth factors requisite for its normal development, even if in the experiments the growth is somewhat stimulated by the addition of small amounts of yeast extract or »*Cossus* extract».

6) The production of conidia is obviously stimulated when cultivation takes place on culture medium containing fairly large amounts of peptone, or asparagin, as source of nitrogen. An addition of yeast extract has a similar effect. Moreover, it is true to say that the culture media producing the best average relative dry-weights of mycelia are also the ones most favourable for conidial production.

The results given by Vouk & Klas were obtained by the application of a rather defective method and in certain respects must be regarded as resting on a very weak foundation. In the main, however, they have received confirmation through my investigations. Slight discrepancies, for instance in regard to the growth optimum and upper temperature limit, are of no consequence and may easily be explained by the fact that we have worked with different biotypes of the fungus, with different culture media and have used different methods for estimating the mycelial growth. It is likely that a similar point of view will also be taken up in regard to the results, differing somewhat from mine, obtained at the temperature investigations made by Notini in 1938.

On the whole one must not lose sight of the relativity of physiological investigations of this kind: the results have absolute validity only in the conditions under which they have been obtained and in so far as they apply to objects of the same origin and »pre-history». Although the picture of the physiology of the fungus obtained from laboratory experiments thus certainly needs to be adjusted in several d e t a i l s in order to be applicable to natural conditions, one may, however, assume that it has universal applicability i n t h e m a i n. The brief statement given above characterizes *M. anisopliae* as a but slightly specialized saprophyte able to attack ve-

getable as well as animal products. As a saprophytic soil fungus its activity is limited by, among other things, a comparatively high temperature optimum and by inability to attack important humus components such as cellulose and tannins. One looks in vain for any special adaptation for its role as facultative insect parasite, even if *M. anisopliae* by a certain thermophily, a relatively high pH optimum, and ability to develop normally even in a culture medium of high alkalinity attaches itself to the majority of other insect parasite fungi (Cf. Blochwitz). The laboratory experiments have, however, demonstrated some of the fundamental conditions for its insect parasitism. To these belong the facility with which the fungus supplies its requirements of carbon, nitrogen and energy by assimilation of animal proteins and the ability of decomposing fats and chitin. The slowness with which the fat decomposition took place in the experiment cultures is certainly in less good agreement with the above-mentioned observations concerning the relation of the fungus to the adipose tissues of the insects. The vigorous mycelial growth in the adipose tissues may, however, be explained by the fact that the fungus there finds not only fats, but also other assimilable substances. Such a simultaneous breakdown of fats and other sources of carbon causes, as Flieg has shown in the case of *Aspergillus niger*, a remarkable increase in the activity, exceeding that which each of the nutrient components alone would have occasioned. The same may be assumed to apply to the decomposition of the chitin, which also took place slowly in the experiment cultures. Concerning the chitin decomposition it is interesting to note, moreover, that the fungus in the experiment cultures behaved differently towards chitin of different origin. It seems probable that the experiments have here given an indication of at least one of the reasons why certain insects are not attacked by *M. anisopliae:* the hyphae cannot force their way through the chitin integument.

Should a utilization of *M. anisopliae* for combating insects prove to be practically realizable, the question of producing conidia on a large scale would naturally arise. More than fifty years ago Krassilstschik reported estimable results in this connection, unfortunately without giving more than sketchy information about the method then used, however. From a technical point of view, however, the problem is hardly likely to offer any very considerable difficulties, as the fungus, as shown above, has no particularly exacting demands either as regards culture medium or other cultivation conditions.

LITTERATUR.

Blochwitz, A.: Schimmelpilze als Tierparasiten. — Ber. d. deutsch. Bot. Ges. 47, 1929, s. 31.

Davis, J. G. and Rogers, H. J.: The effect of sterilisation upon sugars. — Centralbl. f. Bakt., Abt. II, 101, 1939, s. 102.

Flieg, O.: Fette und Fettsäuren als Material für Bau- und Betriebsstoffwechsel von Aspergillus niger. — Jahrb. f. wiss. Bot. 61, 1922, s. 24.

Fries, N.: Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. — Symb. bot. ups. III: 2, 1939.

Kostytschew, S.: Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. Erster Band: Chemische Physiologie. Berlin 1926.

Krassilstschik, J.: La production industrielle des parasites végétaux pour la destruction des insectes nuisibles. — Bull. Scient. de la France et de la Belgique 19, 1888, s. 461.

Lindeberg, G.: Über den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum verschiedener Marasmiusarten. — Sv. Bot. Tidskr. 33, Stockholm 1939, s. 341.

Melin, E.: Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. — Handb. d. biol. Arbeitsmethoden. Hgg. von E. Abderhalden, Abt. XI, 4, 1936.

Molliard, M.: Sur une nouvelle fermentation acide produite par le Sterigmatocystis nigra. — C. R. Ac. Sc. Paris 174, 1922, s. 881.

Notini, G.: Undersökningar rörande på rödklöver levande spetsvivlar (Apion Herbst). 2. Ekologiska undersökningar. (Zusammenfassung in deutscher Sprache.) — Statens Växtskyddsanstalt, Meddel. nr 22, Stockholm 1938.

Vouk, V. und Klas, Z.: Über einige Kulturbedingungen des insektentötenden Pilzes Metarrhizium anisopliae (Metsch.) Sor. — Acta bot. inst. bot. univ. Zagrebensis 7, 1932.

Emil Kihlströms Tryckeri A.-B.
Stockholm 1944
22623